

**RETINOPATIA DIABÉTICA:
UMA DOENÇA NEURODEGENERATIVA ANTES
DE UMA DOENÇA VASCULAR?**

JOANA PATRÍCIA TAVARES FERREIRA

**Tese para obtenção do grau de Doutor em Medicina,
na Especialidade de Oftalmologia
na Nova Medical School I Faculdade de Ciências Médicas**

Setembro, 2016

**RETINOPATIA DIABÉTICA:
UMA DOENÇA NEURODEGENERATIVA ANTES
DE UMA DOENÇA VASCULAR?**

Joana Patrícia Tavares Ferreira

Orientador: Luís Abegão Pinto, Professor Doutor

Coorientadora: Ana Luísa Papoila, Professora Doutora

**Tese para obtenção do grau de Doutor em Medicina,
na Especialidade de Oftalmologia**

Setembro, 2016

"A mente que se abre a uma nova ideia nunca mais volta ao seu tamanho original."

Albert Einstein (1879-1955)

Aos meus Pais Joaquim e Ondina

e à minha irmã Quirina

AGRADECIMENTOS

Para que esta tese de Doutoramento se tornasse realidade foi necessário o apoio de várias pessoas e instituições.

Desta forma agradeço:

Ao meu orientador, Professor Doutor Luís Abegão Pinto, pela elevada competência na orientação, pelo apoio incondicional e pela confiança depositada em mim e no meu projeto de tese. O seu empenho e dedicação neste trabalho são de enaltecer, agradeço não só todos os ensinamentos e reflexões ímpares mas acima de tudo a amizade e companheirismo evidenciados em todos os momentos.

À minha coorientadora, Professora Doutora Ana Luísa Papoila, por toda a sua dedicação e profissionalismo desempenhados, pelo seu apoio e disponibilidade constantes e pelas apreciações construtivas, que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

À Dra. Marta Alves pelo seu incansável trabalho, pela paciência e dedicação demonstradas neste projeto.

Ao Dr. João Paulo Cunha por ter sido o primeiro a acreditar nesta minha nova etapa, o Doutoramento, e dessa forma me ter entusiasmado a abraçar esta meta. Por confiar sempre em mim, por estar sempre presente em qualquer momento, pela partilha de todo o seu conhecimento muito para além da Oftalmologia, pelos conselhos de vida. Obrigada por toda esta amizade incondicional!

Ao Dr. Gonçalo Agudo, pela disponibilidade para a execução de todos os exames complementares necessários.

A todos os doentes que aceitaram participar neste estudo e que de alguma forma acreditaram nele como uma mais-valia para a ciência. Obrigada a todos os doentes que todos os dias por mim passam e que me fazem cada vez mais gostar de ser Médica!

Aos meus amigos João Godinho Duarte, Frederico Saraiva Cruz, André Vicente, Rita Proença, Mariana Sá Cardoso, Arnaldo Santos, Joana Serra Caetano, entre tantos outros, pela vossa amizade, pela partilha de tantos momentos, alegrias e tristezas, obrigada por estarem sempre comigo!

A todos os profissionais do Serviço de Oftalmologia do Centro Hospitalar de Lisboa Central, Diretor Dr. Miguel Trigo, Assistentes Hospitalares, Internos do Internato de Formação Específica em Oftalmologia, Técnicos de Oftalmologia, Enfermeiros, Assistentes Operacionais, pelo vosso apoio para que este trabalho fosse possível de se concretizar.

A nível institucional, agradeço à José Mello Saúde pelo reconhecimento que depositou neste projeto através da atribuição da Bolsa de Doutoramento. Ao Centro Hospitalar de Lisboa Central por ter aprovado e permitido a elaboração da parte prática e clínica desta tese. À Faculdade de Ciência Médicas da Universidade Nova de Lisboa e ao Coordenador do Doutoramento em Medicina, Professor Doutor Roberto Palma dos Reis, pela disponibilidade e apoio prestados quando assim foi necessário.

Por fim, mas com a maior gratidão, à minha família;

Aos meus pais, Joaquim e Ondina Ferreira, pela vida, por todos os ensinamentos, por acreditarem em mim e me apoiarem incondicionalmente, pelo vosso amor sempre demonstrado. Obrigada por serem o meu maior exemplo de coragem e determinação!

À minha irmã, Quirina Ferreira, por todo o suporte e companheirismo, pela compreensão e ajuda em qualquer momento, pela amizade incondicional. Obrigada por todo o teu amor!

Ao meu cunhado, Bruno Oliveira Santos, pela sua disponibilidade constante para me apoiar, pela sua compreensão e amizade.

Muito Obrigada a todos!

ÍNDICE GERAL

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO	31
1. DIABETES MELLITUS.....	31
1.1. Definição e classificação.....	31
1.2. Epidemiologia e impacto socioeconómico.....	31
1.3. Diagnóstico.....	33
1.4. Classificação	34
1.4.1. Diabetes Mellitus tipo 1	34
1.4.2. Diabetes Mellitus tipo 2	35
1.4.3. Diabetes Mellitus gestacional	35
1.4.4. Outros tipos específicos de Diabetes Mellitus.....	35
1.5. Complicações.....	36
1.5.1. Complicações microvasculares	36
1.5.1.1. Retinopatia diabética	36
1.5.1.2. Nefropatia diabética	36
1.5.1.3. Neuropatia diabética	36
1.5.2. Complicações macrovasculares	37
2. RETINOPATIA DIABÉTICA	39
2.1. Epidemiologia e impacto socioeconómico.....	39
2.2. Fisiopatologia	40
2.3. Classificação	44
2.4. Fatores de risco	47
2.5. Manifestações clínicas	49
2.6. Estratégias diagnósticas	50
2.6.1. Rastreio.....	50
2.6.2. Angiografia fluoresceínica.....	52
2.6.3. Ecografia	53
2.6.4. Tomografia de coerência ótica	53
3. COROIDOPATIA DIABÉTICA	57
3.1. Anatomia e fisiologia da coróide	57
3.2. Espessura da coróide e variações fisiológicas	59
3.3. Coróide e diabetes	60

CAPÍTULO II – OBJETIVOS	61
1. OBJETIVO GERAL	61
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	61
CAPÍTULO III – MÉTODOS.....	63
1. LOCAL DE EXECUÇÃO	63
2. POPULAÇÃO	64
3. CONSENTIMENTO INFORMADO	65
4. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	66
5. DESENHO EPIDEMIOLÓGICO E PLANEAMENTO	67
6. PROCEDIMENTOS	68
6.1. Acuidade visual.....	68
6.2. Pressão intraocular	68
6.3. Retinografia.....	69
6.4. Tomografia de coerência ótica - <i>Spectral Domain</i>	69
6.5. Pressão arterial média	71
7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	72
CAPÍTULO IV – RESULTADOS	75
1. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS DA POPULAÇÃO	75
2. CORÓIDE – EDI-OCT	79
2.1. Visita V1	79
2.1.1. Associações entre a espessura da coróide e fatores sistêmicos e oculares	79
2.1.2. Associações entre a espessura da coróide e fatores sistêmicos e oculares: diabéticos <i>versus</i> não diabéticos	81
2.2. Visita V2	85
2.2.1. Análise exploratória da espessura da coróide	85
2.2.2. Associações entre a espessura da coróide e fatores sistêmicos e oculares	86
3. CAMADAS DA RETINA.....	88
3.1. Visita V1	88
3.2. Visita V2	96
3.2.1. Análise exploratória da espessura da retina	96
3.2.2. Associações entre a espessura da retina e fatores sistêmicos e oculares.....	99
CAPÍTULO V – DISCUSSÃO	105
CORÓIDE	108
CAMADAS DA RETINA.....	114
CAPÍTULO VI – CONCLUSÕES	119

CAPÍTULO VII – PERSPETIVAS FUTURAS	121
BIBLIOGRAFIA.....	125

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Comparação das interações neuronais e vasculares em condições não diabéticas (A) e condições diabéticas (B).....	43
Figura 2 - Segmentação das camadas retinianas.	69
Figura 3 - Esquema representativo do mapa de espessura macular obtido a partir do <i>Spectral Domain-Optical Coherence Tomography</i> (protocolo <i>Early Treatment Diabetic Retinopathy Study</i>).	70
Figura 4 - Medições da espessura da coróide em 13 localizações: na zona subfoveal (A) e em intervalos de 500 µm até 1500 µm nasal (A), temporal (A), superior (B) e inferior (C) à fóvea.	71
Figura 5 - Fluxograma do estudo longitudinal.	78
Figura 6 - Associação entre a espessura da coróide e a duração da diabetes.	83
Figura 7 - Associação entre a espessura da coróide e a glicemia (A) e a hemoglobina glicada (HbA1c) (B).	83
Figura 8 - Associação entre a espessura da coróide e a Pressão Arterial Média (PAM), em ambos os grupos: não diabéticos (A) e diabéticos (B).	84
Figura 9 - Gráficos das diferentes espessuras das camadas da retina nos quatro grupos.....	89
Figura 10 - Gráficos das diferentes espessuras das camadas da retina nos doentes diabéticos com e sem retinopatia diabética, visita V2.	97

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação Clínica Internacional da retinopatia diabética / Graus de gravidade da retinopatia diabética (GDRPG - <i>Global Diabetic Retinopathy Project Group</i> 2002) ...	45
Tabela 2 - Classificação da retinopatia diabética proliferativa	46
Tabela 3 - Classificação Clínica Internacional do edema macular diabético / Graus de gravidade do edema macular diabético (GDRPG - <i>Global Diabetic Retinopathy Project Group</i> 2002)	46
Tabela 4 - Orientação oftalmológica de acordo com a gravidade da retinopatia diabética....	51
Tabela 5 - Orientação oftalmológica de acordo com a gravidade do edema macular diabético	51
Tabela 6 - Procedimentos realizados em cada visita	67
Tabela 7 - Características demográficas e clínicas por grupo	75
Tabela 8 - Fármacos de cada grupo de doentes	76
Tabela 9 - Características demográficas e clínicas dos doentes diabéticos (Visita 2)	77
Tabela 10 - Espessura da coróide (μm) nas 13 localizações, por grupo	79
Tabela 11 - Resultados dos modelos de regressão linear multivariáveis - Coróide	80
Tabela 12 - Resultados dos modelos de regressão linear multivariáveis para o grupo diabético	82
Tabela 13 - Espessura da coróide (μm) nas 13 localizações na visita V2 no grupo diabético ..	85
Tabela 14 - Diferenças entre as visitas V2 e V1 da espessura da coróide (μm),	86
Tabela 15 - Resultados dos modelos de regressão linear multivariáveis - Visita V2.....	87
Tabela 16 - Características demográficas e clínicas dos doentes por grupo	88
Tabela 17 - Modelos de regressão multivariáveis para a espessura da	91
Tabela 18 - Modelos de regressão multivariáveis para a espessura da camada nuclear interna	92
Tabela 19 - Modelos de regressão multivariáveis para a espessura da camada do	93
Tabela 20 - Modelos de regressão multivariáveis para a espessura da camada de fotorreceptores	95
Tabela 21 - Diferenças entre as espessuras da retina total e da camada de fotorreceptores obtidas nas visitas V2 e V1 (μm) nas áreas ETDRS no Grupo Diabético.....	98
Tabela 22 - Modelos de regressão multivariáveis para a espessura da retina total (Visita V2).....	100
Tabela 23 - Modelos de regressão para a espessura da camada de fibras nervosas da retina (Visita V2).....	101

Tabela 24 - Modelos de regressão multivariáveis para a espessura da camada de células gnaglioneares (Visita V2)	101
Tabela 25 - Modelos de regressão multivariáveis para a espessura da camada plexiforme interna (Visita V2).....	102
Tabela 26 - Modelos de regressão multivariáveis para a espessura da camada nuclear interna	103
Tabela 27 - Modelos de regressão multivariáveis para a espessura da camada plexiforme externa (Visita V2)	103
Tabela 28 - Modelos de regressão multivariáveis para a espessura da camada nuclear externa	104
Tabela 29 - Modelos de regressão multivariáveis para a espessura da camada de fotorreceptores (Visita V2).....	104

ABREVIATURAS

ACSS	Administração Central do Sistema de Saúde
ADA	American Diabetes Association
AGEs	Advanced Glycation End-products
AGJ	Anomalia da Glicemia em Jejum
AF	Angiografia Fluoresceínica
APO	Amplitude de Pulso Ocular
AVC	Acidente Vascular Cerebral
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
BHR	Barreira Hemato-Retiniana
C	Setor Central
CCG	Camada de Células Ganglionares
CCTLs	Canais de Cálcio Tipo L
CFNR	Camada de Fibras Nervosas da Retina
CHLC	Centro Hospitalar de Lisboa Central
CNE	Camada Nuclear Externa
CNI	Camada Nuclear Interna
CPE	Camada Plexiforme Externa
CPI	Camada Plexiforme Interna
D	Dioptrias
DCCT	Diabetes Control and Complications Trial
DCV	Doença Cardiovascular
DD	Diâmetro de Disco
DG	Diabetes Gestacional
DGS	Direção Geral de Saúde
DM	Diabetes Mellitus
DO	Disco Ótico
DP	Desvio Padrão
DRS	Diabetic Retinopathy Study
EDI	Enhanced Depth Imaging
EDIC	Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications
EMCS	Edema Macular Clinicamente Significativo
EMD	Edema Macular Diabético
EPR	Epitélio Pigmentado da Retina
ETDRS	Early Treatment of Diabetic Retinopathy Study
EUA	Estados Unidos da América
FR	Fotorreceptores
FD	Fourier Domain
GDRPG	Global Diabetic Retinopathy Project Group
GER	Grupo de Estudos em Retina
HbA1c	Hemoglobina Glicada A1c
HTA	Hipertensão Arterial
I3	Setor Inferior 3 mm
I6	Setor Inferior 6 mm

IECA	Inibidores da Enzima de Conversão da Angiotensina
IGF-1	Insulin-like Growth Factor 1
IMC	Índice de Massa Corporal
INSA	Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
IQR	Interquartil Range
IRMAs	Intraretinal Microvascular Abnormalities
LDES	Liverpool Diabetic Eye Study
LDL	Low Density Lipoprotein
LogMAR	Logaritmo do Ângulo Mínimo de Resolução
MAVC	Melhor Acuidade Visual Corrigida
N3	Setor Nasal 3 mm
N6	Setor Nasal 6 mm
NV	Neovascularização
OCT	Optical Coherence Tomography
OCTA	Optical Coherence Tomography Angiography
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAM	Pressão Arterial Média
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PIB	Produto Interno Bruto
PIO	Pressão Intraocular
PKC	Proteína Quinase C
PTGO	Prova de Tolerância à Glicose Oral
Q	Qualidade
R	Range
RAA	Renina-Angiotensina-Aldosterona
RD	Retinopatia Diabética
RDNP	Retinopatia Diabética Não Proliferativa
RDP	Retinopatia Diabética Proliferativa
RDR	Retinopatia Diabética Referenciável
RT	Retina Total
S3	Setor Superior 3 mm
S6	Setor Superior 6 mm
SD	Spectral Domain
SNS	Serviço Nacional de Saúde
SPO	Sociedade Portuguesa de Oftalmologia
SS	Swept Source
T3	Setor Temporal 3 mm
T6	Setor Temporal 6 mm
TD	Time Domain
TDG	Tolerância Diminuída à Glicose
UKPDS	United Kingdom Prospective Diabetes Study
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WESDR	Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy

RESUMO

A Diabetes Mellitus (DM) é uma das doenças crónicas mais comuns em quase todos os países do mundo e constitui um problema crítico de saúde pública, sendo inclusivamente considerada uma pandemia do século XXI. Enquanto a prevalência estimada para 2013 foi de 382 milhões de pessoas, em 2015 415 milhões de pessoas viviam com DM e espera-se que em 2035 a DM afete 592 milhões de pessoas a nível mundial. Destes valores, a DM tipo 2 representa 90 a 95% da população diabética. Em Portugal, em 2014 a prevalência estimada de DM na população com idades compreendidas entre os 20 e os 79 anos (7.7 milhões de indivíduos) foi de 13.1%.

Dos 415 milhões de pessoas com DM a nível mundial registados em 2015, mais de um terço irá desenvolver alguma forma de retinopatia diabética (RD) ao longo da vida. A RD é a principal causa de novos casos de cegueira legal entre os americanos em idade laboral. Nos EUA, a prevalência de RD em adultos com mais de 40 anos é de 3.4% (4.1 milhões de pessoas), sendo a prevalência de retinopatia que ameaça a visão de 0.75% (899 mil pessoas). Assumindo, neste país, uma prevalência semelhante à descrita, os números projetados para 2020 seriam de 6 milhões de pessoas com RD e 1.34 milhões de pessoas com possível cegueira por RD. Em Portugal, o estudo RETINODIAB identificou uma prevalência de RD de 16.3%, isto é, 8584 doentes e uma incidência de RD de 4.60% no primeiro ano e de 3.87% no quinto ano, com uma incidência cumulativa aos 5 anos de 14.47%.

Atualmente, a Classificação Clínica Internacional da RD subdivide-a em diferentes estadios conforme as alterações microvasculares observáveis à fundoscopia, definindo que os doentes sem estas características não apresentavam RD. No entanto, diferentes estudos em modelos animais e *post-mortem* têm identificado que, para além da RD ser uma doença microcirculatória da retina, é também uma patologia neurodegenerativa. Este conceito foi pela primeira vez introduzido por Barber *et al.*, que verificou que após induzir o desenvolvimento de diabetes em ratos, estes apresentavam uma elevada taxa de apoptose da neurorretina sem qualquer apoptose das células endoteliais. Outros estudos em modelos experimentais demonstraram ainda que para além desta apoptose das células ganglionares da retina, dos fotorreceptores e do epitélio pigmentado da retina, outra característica da neurodegeneração retiniana é a ativação glial. Para além disto, alterações vasculares a nível da coróide, idênticas às da retina, foram identificadas em estudos histológicos, mesmo antes do aparecimento de lesões vasculares fundoscopicamente observáveis, não se conhecendo ainda qual a importância temporal desta estrutura para o aparecimento da RD.

Apesar de conhecermos as características de neurodegeneração descritas, estas ainda não foram integradas na prática clínica. Mesmo com os novos avanços tecnológicos na avaliação da RD, esta continua a basear-se nas alterações vasculares fundoscópicas.

Recentemente, a tomografia de coerência ótica (OCT) tem sido introduzida na prática clínica como um dos métodos não invasivos e objetivos para visualizar a retina, mostrando os seus detalhes como se de um exame histológico se tratasse. Ultimamente, através de *software* de segmentação, tem sido possível fazer uma análise quantitativa e qualitativa das espessuras de todas as camadas da retina e da coróide.

Assim, o objetivo deste projeto foi identificar alterações retinianas e coróideas em doentes diabéticos sem RD pela sua comparação com indivíduos não diabéticos e, posteriormente, fazer o seguimento destes doentes diabéticos ao longo de um ano de forma a identificar como as referidas alterações estruturais se comportam com o tempo. Foi definido ainda como objetivo secundário verificar qual a associação das alterações das camadas da retina e coróide dos doentes diabéticos com fatores demográficos (idade e género), sistémicos (duração da diabetes, pressão arterial média (PAM), glicemia e hemoglobina glicada (HbA1c) e hábitos farmacológicos) e oculares (pressão intraocular (PIO), amplitude de pulso ocular (APO), equivalente esférico e comprimento axial).

Foi planeado um estudo longitudinal com a maior série publicada sobre o tema até à data, para o qual foram recrutados 175 doentes (125 doentes diabéticos tipo 2 sem RD e 50 indivíduos não diabéticos). Todos os doentes foram submetidos, numa primeira visita V1, a uma avaliação oftalmológica completa com a realização de *Spectral Domain* (SD)-OCT com e sem *software enhanced depth imaging* (EDI). A espessura da coróide foi avaliada manualmente em 13 localizações (subfoveal e 3 medições com intervalos de 500 µm em 4 direções – nasal, temporal, superior e inferior). Após segmentação automática, a espessura de cada camada da retina (8 camadas individualizadas e a espessura da retina total - RT) foi calculada nas 9 áreas *Early Treatment Diabetic Retinopathy Study* (ETDRS). Após um ano de seguimento, todos os doentes diabéticos foram novamente convocados para uma nova visita V2 onde foram submetidos aos mesmos exames já referidos.

Em comparação com os indivíduos não diabéticos, apesar da ausência de significância estatística, verificou-se nos doentes diabéticos sem RD uma tendência para a espessura da coróide ser superior em todas as localizações (entre 6.16 e 24.27 µm). A espessura da coróide associou-se de forma negativa com a idade ($p < 0.001$) em ambos os grupos, assim como de

forma positiva com a APO, mas só no grupo de doentes diabéticos (por cada mmHg de aumento da APO a espessura da coróide aumentou, em média 8.5 a 11.6 μm).

Relativamente à análise das diferentes camadas da retina, os doentes diabéticos foram classificados de acordo com a duração da diabetes em três grupos: grupo I (< 5 anos, n=55), grupo II (5–10 anos, n=39), e grupo III (>10 anos, n=31). No grupo I e III, em 6 áreas ETDRS, foi identificada uma diminuição da espessura da camada de fotorreceptores (FR) quando comparada com a dos indivíduos não diabéticos, ($p < 0.0007$). Os doentes com duração de doença moderada (grupo II) apresentaram valores de FR superiores ao grupo I e III. Interessantemente, doentes com doença há mais tempo (grupo III) tiveram os menores valores de FR. Não se identificaram diferenças significativas nos restantes parâmetros retinianos.

Após um ano de seguimento, dos 125 doentes, 103 completaram o estudo (*attrition rate* de 17.6%) e 9 desenvolveram RD (8.7%). A espessura da coróide manteve a sua tendência crescente, apresentando na visita V2 valores superiores (entre 10.01 e 17.34 μm) relativamente à visita V1 ($p < 0.001$ a 0.003). Por outro lado, no que diz respeito à retina, as espessuras das camadas de células ganglionares (CCG) (setores I3 e N6), camada plexiforme interna (CPI) (setores S6 e N6), camada nuclear interna (CNI) (setores T6 e N6), camada plexiforme externa (CPE) (setor S6) e espessura da RT (setores S3, I3, N3, S6 e T6) foram menores na V2 que na V1 ($p < 0.001$). Nesta V2, a espessura RT diminuiu, em média, entre 1.74 e 3.26 μm , nos doentes diabéticos independentemente de terem desenvolvido RD. Na análise relativa aos doentes que desenvolveram RD, observou-se, que estes tinham valores de espessura da coróide menores em relação aos doentes sem RD (230.28 a 280.10 μm *versus* 217.00 a 269.56 μm), no entanto, sem significado estatístico. Neste grupo também se verificou que a RD se encontrou associada de forma negativa com a espessura de RT (setores central, S3, T3, I3 e N3; $p = 0.004$ a 0.024), da camada nuclear externa (CNE) (setores T6 e I6; $p = 0.007$ e 0.009) e camada de FR (setor N6; $p = 0.038$). A espessura da RT diminuiu entre 13.04 e 16.63 μm nos doentes com presença de RD.

Em conclusão, os doentes diabéticos sem RD têm menores espessuras significativas de FR e uma tendência para uma maior espessura da coróide comparativamente com os indivíduos não diabéticos. Possivelmente, sendo a coróide um tecido vascular, que ao contrário dos vasos retina, apresenta uma capacidade de autorregulação controversa, é afetada mais precocemente do que esta última. Também o padrão de associações da espessura da coróide, diferente nos dois grupos, leva-nos a supor a presença de sinais de coroidopatia diabética já identificada em estudos histológicos mesmo em doentes diabéticos sem RD. Após esta fase de aumento da espessura da coróide, que eventualmente traduz edema e extravasamento vascular, verificou-

se que os doentes diabéticos que desenvolvem RD apresentaram valores de espessura coróideia menores, traduzindo a fase atrófica deste tecido abundantemente vascular.

Por outro lado, na visita V1 foi verificado que a camada retiniana que mais precocemente se encontra afetada, e diminuída face aos indivíduos não diabéticos, é a camada dos FR. Esta é a camada de células mais metabolicamente ativas, e ao contrário das camadas mais internas, é nutrida pela coróide. Encontrando-se a coróide precocemente alterada a camada de FR por consequência também apresentará alterações. Outra causa possível para a perda dos FR, pode ser o efeito direto da hiperglicemia e hipoinsulinemia. A DM provoca alterações na via de sinalização da insulina nos FR, originando defeitos na via da neuroprotecção dos mesmos.

Um dos resultados mais interessantes deste estudo foi o padrão não uniforme de menor espessura da camada de FR de acordo com a duração da diabetes. Esta observação pode ser explicada por um edema celular temporário devido à hipoxia induzida pela diabetes que por sua vez origina stress oxidativo com aumento da produção de superóxido e outras espécies reativas de oxigénio (ROS) a nível da retina. As ROS induzem a libertação de um conjunto de moléculas pró-inflamatórias, a sintetase do óxido nítrico (NOS) e a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), com consequente alteração a nível dos vasos retinianos e do espaço extravascular. Por fim, a este contínuo edema celular seguir-se-ia um processo atrófico explicando, assim, a menor espessura da camada de FR encontrada no grupo de doentes diabéticos com DM há mais anos (grupo III). Este comportamento não linear é importante para poder explicar alguns resultados contraditórios de diferentes estudos desta área, uma vez que cada um deles pode recrutar doentes com diferentes durações de diabetes.

Os doentes diabéticos ao fim de 1 ano de seguimento revelaram diminuição significativa não só da espessura da RT assim como de alguns setores das camadas internas, independentemente de terem desenvolvido RD. Quando observamos os doentes que desenvolveram RD verificamos uma maior diminuição da espessura de RT e FR. Estas alterações estruturais podem corresponder a uma fase precoce da RD, de neurodegeneração e ser potencialmente importantes para identificar quais os doentes em risco de desenvolver RD.

As limitações deste estudo devem-se particularmente a falhas metodológicas e inerentes à maioria dos estudos que incluem doentes diabéticos tipo 2. Uma das limitações diz respeito à duração da doença, uma vez que o seu início (particularmente DM tipo 2) é insidioso e os doentes só o podem relatar após o diagnóstico feito com base nos achados clínicos e analíticos. Desta forma, a duração da doença pode ter sido subestimada. Quanto à metodologia, as medições da espessura da coróide foram realizadas manualmente. Contudo, esta segmentação

manual tem demonstrado elevada reprodutibilidade intra e interobservador. A avaliação da espessura da retina foi realizada com um *software* automático. No entanto, quando foram encontrados erros nesta segmentação automática, foi realizada a correção manual, por um oftalmologista desconhecedor do diagnóstico dos doentes. Relativamente à análise da espessura da coróide, o estado de hidratação e o índice de massa corporal (IMC) não foram tidos em conta. Foi tido em conta a variabilidade circadiana realizando todos os exames à mesma hora do dia e no mesmo ambiente. Os recentes estudos relativos ao IMC são controversos. Desta forma, o IMC deve ser incluído em estudos futuros na tentativa de eliminar este fator de confundimento. A análise da retina teve outra limitação que se prende com a subdivisão da amostra em grupos, de acordo com a duração da doença, que pode dificultar a capacidade de subavaliar as diferentes espessuras da retina, apesar de este ser um dos maiores estudos nesta área – 125 doentes sem RD. Ainda assim, a análise dos subgrupos foi muito interessante e fornece uma nova base para futuros estudos.

Mais ainda, uma das vantagens deste trabalho foi a criação de uma base de dados que permitirá, através da interdisciplinaridade de diferentes áreas e departamentos nacionais e internacionais, o aparecimento de novas linhas de investigação. Uma delas poderá incidir sobre a determinação de valores preditivos das diferentes camadas da retina e coróide que nos ajudem a identificar quais os doentes diabéticos em risco de desenvolver RD. Outra vertente possível será a complementação desta análise estrutural com estudos de ciência básica, de forma a identificar quais as variáveis biológicas que interferem na análise e que hoje não são conhecidas. Finalmente, o culminar destes trabalhos poderá eventualmente conduzir a uma possível revisão da própria classificação da RD e ainda servir de base a estudos farmacológicos já existentes no âmbito da neuroprotecção.

ABSTRACT

Diabetes Mellitus (DM) is one of the most common chronic diseases in the world and is a critical public health problem that could even be considered a pandemic. While the estimated prevalence for DM in 2013 was 382 million people, in 2015 415 million people were living with diabetes and this number is expected to rise up to 592 million people worldwide in 2035. 90 to 95% of the diabetic population has type 2 DM. In 2014 the estimated prevalence of DM in the Portuguese population aged between 20 and 79 years old (7.7 million individuals) was 13.1%.

Of the 415 million diabetic patients worldwide in 2015 more than one-third will develop some form of diabetic retinopathy (DR). DR is the leading cause of legal blindness among Americans of working age. The prevalence of DR in adults over 40 years in the US is 3.4% (4.1 million people), and the prevalence of retinopathy that threatens vision is 0.75% (899 000 people). Assuming a similar prevalence of DM, the estimated numbers for 2020 would be 6 million people with DR and 1.34 million people with possible blindness caused by DR. In Portugal, the RETINODIAB study identified a prevalence of DR of 16.3% (8584 patients) and a DR incidence of 4.60% in the first year and 3.87% in the fifth year, with a cumulative incidence at 5 years of 14.47%.

The International Clinical Classification of DR divides this pathology in different stages according to fundus microvascular changes. Therefore, it states that patients without these changes do not have DR. However, studies in different animal models or *post-mortem* have proved that DR is not only a microcirculatory disease of the retina but also a neurodegenerative disease. This concept was first introduced by Barber *et al.* that found that after inducing diabetes in mice, they exhibited a high rate of neuroretinal apoptosis without endothelial cell apoptosis. Other studies have shown, in experimental models that in addition to apoptosis of retinal ganglion cells, photoreceptors, retinal pigment epithelium and retinal neurodegeneration, glial activation is also present. Moreover, changes in the vascular choroid similar to the retina were found in histological studies even before the onset of observable vascular lesions. The chronological importance of the changes of this structure for the appearance of DR still has to be further explored.

Although neurodegeneration features of this disease have been described, they still have not been included in the clinical practice. Even the new technological advances in DR evaluation continue to be based upon the assessment of vascular changes.

Recently, optical coherence tomography (OCT) has been introduced in clinical practice as a non-invasive and objective method to study the retina, showing its details with a resolution similar

to a histological examination. More recently, with the segmentation software a quantitative and qualitative analysis of the thicknesses of all retinal and choroidal layers are now possible.

The aim of this project was to identify retinal and choroidal changes in diabetic patients without DR by comparison with non-diabetic subjects and then to follow up these diabetic patients over a year to identify how these structural differences change with time. A secondary objective that was established was to evaluate the association of changes in retinal layers and choroid of diabetic patients with demographic (age and gender), systemic (duration of diabetes, mean arterial pressure (MAP), blood glucose and glycated hemoglobin (HbA1c), drug habits) and ocular factors (intraocular pressure (IOP), ocular pulse amplitude (OPA), spherical equivalent and axial length).

A longitudinal study with the largest sample published to date was planned, for which 175 patients were recruited (125 type 2 diabetic patients without DR and 50 non-diabetic subjects). All patients were submitted, in a first visit V1, to a complete ophthalmologic evaluation with Spectral Domain (SD) -OCT with and without software enhanced depth imaging (EDI). Choroidal thickness was manually evaluated in 13 locations (subfoveal and 3 measurements with intervals of 500 μm in 4 directions - nasal, temporal, superior and inferior). After automatic segmentation, the thickness of each retinal layer (8 individual layers and the thickness of the overall retinal-RT) was calculated in the 9 areas Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS). After a year of follow-up, all diabetic patients were observed again in a new visit V2 and were evaluated in the same way as mentioned above.

In comparison with non-diabetic subjects, despite the lack of statistical significance, it was found that in diabetic patients without DR there is a tendency for the choroidal thickness to be increased in all locations (between 6.16 and 24.27 μm). Choroidal thickness was negatively associated with age ($p < 0.001$) in both groups, and positively with OPA, but only in the diabetic group (for each mmHg increase in OPA, choroidal thickness increased on average, between 8.5 and 11.6 μm .)

For the analysis of the different retina layers, diabetic patients were classified according to duration of diabetes into three groups: group I (<5 years, $n = 55$), group II (5-10 years, $n = 39$), group III (> 10 years, $n = 31$). In groups I and III, in 6 ETDRS areas, a decrease in the thickness of the photoreceptors layer (PR) was identified when compared with non-diabetic subjects ($p < 0.0007$). Moreover, patients with moderate disease duration (group II) showed higher PR values than group I and III. Interestingly, patients with longer disease duration (group III) had the lowest PR values. No significant differences were identified in other retinal parameters.

After a year of follow-up, from the 125 patients, 103 completed the study (attrition rate of 17.6%) and 9 developed DR (8.7%). The choroidal thickness maintained its upward trend, with higher values in visit V2 (between 10.01 and 17.34 μm) than visit V1 ($p < 0.001-0.003$). On the other hand, in the retina, the thickness of the ganglion cell layer (GCL) (I3 and N6 sectors), inner plexiform layer (IPL) (S6 and N6 sectors), inner nuclear layer (INL) (T6 and N6 sectors), outer plexiform layer (OPL) (S6 sector) and thickness of the RT (S3 sectors, I3, N3, S6 and T6) were lower in V2 than in V1 ($p < 0.001$). In V2, the RT thickness decreased on average between 1.74 and 3.26 μm in diabetic patients regardless of whether they developed DR or not. The patients who developed DR had smaller choroidal thickness values compared to patients without DR (230.28 to 280.10 μm versus 217.00 to 269.56 μm) but without statistical significance. In this group, DR was associated negatively with the RT thickness (central sectors S3, T3 I3 and N3, $p = 0.004-0.024$), ONL (T6 and I6 sectors; $p = 0.007$ and 0.009) and PR layer (N6 sector, $p = 0.038$). The presence of DR was associated with a decreased of the RT thickness of 13.04 to 16.63 μm .

In conclusion, diabetic patients without DR have smaller PR layer thicknesses and a trend for a greater choroidal thickness when compared with non-diabetic subjects. Choroid is a vascular tissue that unlike the retinal vessels, has a controversial auto-regulation, and can possibly turn out to be affected earlier than the retina. Moreover, the fact that the pattern of associations of choroidal thickness is different in the two groups, can lead us to suppose the presence of diabetic choroidopathy signals already identified in histological studies even in diabetic patients without DR. After this phase of increased choroidal thickness, which possibly reflects swelling and vascular leakage, it was found that diabetic patients that develop DR begin to have lower choroidal thickness, similar to an atrophic phase of this vascular tissue.

On the other hand, in the visit V1 it was determined that the retinal layer that is affected earlier and decreased compared to non-diabetic subjects is the photoreceptor layer. This layer has the most metabolically active cells and is nourished by the choroid. As the choroid layer is earlier affected, the PR layer will therefore also present changes. Another possible cause for the loss of PR can be the direct effect of hyperglycemia and hypoinsulinemia. DM causes changes in the insulin signaling pathway in PR, causing defects in neuroprotection pathways.

One of the most interesting results from this study was the non-uniform pattern of decreased PR layer thickness according to the duration of diabetes. This observation may be explained by a temporary cell edema due to various reasons. Hypoxia-induced diabetes lead to oxidative stress with increased superoxide production and other reactive oxygen species (ROS) within the retina, which induce the release of pro-inflammatory molecules, nitric oxide synthase (NOS) and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), and cause changes in the retinal vessels and

extravascular space. Finally, this continuous cellular edema instigates atrophy that can explain the thinner PR layer found in the group of diabetic patients with DM of longer duration (group III). This non-linear behavior is important to understand some contradictory results of different studies in this area, since patients with different diabetes disease duration may be recruited.

Diabetic patients at 1 year follow-up showed a significant decrease in the thickness of overall retina as well as in some sectors of the inner layers, regardless of the development of DR. Patients who developed DR present a persistence of the decrease in the thickness of RT and PR. These structural changes may correspond to an early phase of DR, neurodegeneration, and might be important to identify patients at risk of developing DR.

The limitations of our study are determined by methodological problems inherent to most studies that include type 2 diabetic patients. Therefore, one of the limitations is related with the duration of the disease, since its beginning (particularly in type 2 diabetes) is insidious and patients can only report it after the diagnosis is made based on clinical and laboratory findings. Thus, the duration of the disease may have been underestimated. Looking at the methodological limitations, measurements of the choroidal thickness were performed manually. However, this manual segmentation has been proved to have a high intra and interobserver reproducibility. Assessment of retinal thickness was performed with an automated software. However, when the automatic segmentation obtained was inaccurate, an ophthalmologist carried out manual correction unaware of the patient's diagnosis. For the analysis of choroidal thickness, hydration status and body mass index (BMI) were not taken into account. However, circadian variability was limited by performing all tests at the same time of day and in the same environment. Recent studies on BMI are controversial. Thus, the BMI should be included in future studies in an attempt to eliminate this possible confounding factor. Retinal analysis had also another limitation related to the fact that although this is one of the largest studies in this area - including 125 patients without DR, by subdividing the sample into groups according to the duration of the disease, the ability to underestimate the different retinal thickness may have been hampered. Even so, subgroup analysis was very interesting and provides a new basis for future studies.

Furthermore, one of the advantages of this work was to create a database, which in the future can contribute for new lines of research with possible national and international interdisciplinary approaches. One of them can focus on determining the predictive value of the different layers of the retina and choroid to help in the identification of diabetic patients at risk of developing DR. Another possible feature would be the backing of this structural analysis with basic science studies in order to identify the biological variables that interfere with the analysis and that are still unknown. Ultimately, this work could eventually lead to a possible revision on the

classification of RD and support pharmacological studies already being performed on neuroprotection.

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

1. DIABETES MELLITUS

1.1. Definição e classificação

A primeira descrição da diabetes remonta a 1552 a.C., em que num Papiro egípcio de Ebers o médico Hesy-Rá, faz referência a uma doença que causava poliúria, polidipsia, polifagia e emagrecimento rápido até à morte. Para tratar esta doença, os médicos da época prescreviam o consumo de folhas de hortelã, dieta e oferendas aos deuses Isis e Osíris. Aretaeus, médico que viveu na Grécia entre os anos 80 d.C. e 138 d.C., criou o termo Diabetes Mellitus (DM) para fazer referência ao gosto adocicado da urina desses doentes ¹. Assim, o termo latino *diabetes* tem origem no vocábulo grego *διαβήτης* ², por sua vez derivado do verbo *διαβαίνω*, que significa “sifão, passar através”, numa referência muito clara ao excesso de urina e à sede contínua; e o termo *mellitus* ³, também proveniente do latim, significa “doce como o mel”, numa referência ao excesso de glicose presente na urina do portador da doença. Só em 1812 é que a DM foi reconhecida como entidade clínica.

A DM é uma doença metabólica de etiologia múltipla, caracterizada por hiperglicemia crónica resultante de uma deficiente secreção ou ação da insulina, ou de ambas. Na grande maioria dos casos a diabetes enquadra-se em duas categorias etiopatogénicas: DM tipo 1 e tipo 2. A DM tipo 1 caracteriza-se por uma deficiência absoluta da secreção de insulina por destruição autoimune das células β do pâncreas, responsáveis pela sua produção. A DM tipo 2 é originada por uma resistência à ação da insulina e consequente secreção inadequada da mesma como resposta compensatória ⁴.

1.2. Epidemiologia e impacto socioeconómico

A DM é uma das doenças crónicas mais comuns em quase todos os países do mundo e constitui um crítico problema de saúde pública, sendo mesmo considerada uma pandemia. O desenvolvimento económico e a urbanização levaram a uma mudança nos estilos de vida caracterizada pela atividade física reduzida e pelo excesso de peso com consequente aumento da prevalência da DM e por sua vez, do seu impacto socioeconómico.

Globalmente a DM é diagnosticada em proporções epidémicas e continua a crescer em todo o mundo. Enquanto a prevalência estimada para 2013 foi de 382 milhões de pessoas, em 2015

415 milhões de pessoas viviam com DM e espera-se que em 2035 a DM afete 592 milhões de pessoas a nível mundial. Destes valores a DM tipo 2 representa 90 a 95% da população diabética. Todos os tipos de diabetes estão a aumentar, no entanto perspetiva-se que a diabetes tipo 2 terá um incremento de 55% até 2035. A carga global da DM em 2013 foi ainda aumentada com cerca de 21 milhões de casos de glicemia elevada na gravidez. Desta forma, 17% dos nados vivos de mulheres em 2013 tinham alguma forma de glicemia elevada durante a gravidez ⁵.

De uma forma economicista, quando olhamos para estes valores de 2013, verificamos que a maioria dos 382 milhões de pessoas com diabetes têm idades compreendidas entre 40 e 59 anos – idade ativa, e que a DM provocou 5.1 milhões de mortes e originou 548 000 milhões de dólares nas despesas de saúde (11% do total gasto em todo o mundo) ⁵.

Os cinco países com o maior número de pessoas com diabetes são a China, a Índia, os Estados Unidos da América (EUA), Brasil e México. As regiões com a maior prevalência de diabetes são as ilhas do Pacífico e o Médio Oriente ⁵.

Em Portugal, em 2014 a prevalência estimada de DM na população com idades compreendidas entre os 20 e os 79 anos (7.7 milhões de indivíduos) foi de 13.1%. Destes, 56% já tinham o diagnóstico de DM enquanto 44% ainda não estavam diagnosticados ⁶. Mais de um quarto da população com DM tem entre 60 a 79 anos de idade, demonstrando um aumento da prevalência com a idade. Quando analisamos os números relativamente ao género verifica-se uma diferença significativa na prevalência da DM entre sexo masculino (15.8%) e feminino (10.8%) ⁷.

Em relação à hiperglicemia intermédia ou pré-diabetes (Anomalia da Glicemia em Jejum (AGJ), Tolerância Diminuída à Glicose (TDG), ou ambas), em 2014, atingiu 27.2% da população portuguesa com idades compreendidas entre os 20 e os 79 anos (2.1 milhões de indivíduos) ⁶.

Quanto à prevalência da DM tipo 1 nas crianças e nos jovens em Portugal, em 2014, era de 3365 indivíduos com idades entre 0 - 19 anos, ou seja 0.16% da população portuguesa neste escalão etário ⁶.

A Diabetes Gestacional (DG) teve uma prevalência de 6.7% em 2014, correspondendo a um aumento significativo relativamente ao ano anterior. Sabe-se que a DG aumenta com a idade das parturientes: mulheres acima dos 40 anos têm uma prevalência de DG de 16.5% ⁶.

O Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes revela ainda, que em 2014, a incidência de DM em Portugal foi de 522 a 662 novos casos por cada 100 000 habitantes, de acordo com dados do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) e da Administração Central do Sistema de Saúde (ACSS), respetivamente. Em relação à DM tipo 1, em 2014, foram detetados

17.5 novos casos por cada 100 000 jovens com idades compreendidas entre os 0 e os 14 anos (valores inferiores aos registados nos últimos anos) ⁶.

Apesar de na última década se ter verificado uma diminuição significativa do número de anos potenciais de vida perdida por DM em Portugal (menos 37%), em 2013 este número correspondia a 8 anos de vida perdida por cada óbito por diabetes na população com idade inferior a 70 anos. A DM foi responsável por 4% das mortes ocorridas em 2014 e representou 24.8% (11 736 indivíduos) da taxa de letalidade intra-hospitalar no Serviço Nacional de Saúde (SNS). O número absoluto de óbitos registados nos internamentos em que a DM foi o diagnóstico principal diminuiu (menos 46% na última década), no entanto, houve um aumento do número de óbitos nos internamentos com registo de DM como diagnóstico associado (mais 44% nos últimos 10 anos) ⁶.

Em 2014 a DM em Portugal representou um custo direto estimado entre 1300 a 1550 milhões de euros, ou seja, 0.7 a 0.9% do Produto Interno Bruto (PIB) português em 2014 (um acréscimo de aproximadamente de 50 milhões de euros face ao ano transato). Se apenas considerarmos a população diabética entre os 20 e os 79 anos diagnosticada em Portugal em 2014 o custo aparente desta doença representa 862 milhões de euros ⁶.

1.3. Diagnóstico

Segundo a Direção Geral da Saúde (DGS), norma nº 2/2001 de 14/01/2011 ⁸, os critérios para o diagnóstico de DM são:

- a) Glicemia em jejum (> 8 horas) ≥ 126 mg/dl (ou ≥ 7.0 mmol/l); ou
- b) Sintomas clássicos de hiperglicemia associados a glicemia ocasional ≥ 200 mg/dl (ou ≥ 11.1 mmol/l); ou
- c) Glicemia ≥ 200 mg/dl (ou ≥ 11.1 mmol/l), 2 horas após ingestão de 75 g de glicose (prova de tolerância à glicose oral (PTGO)); ou
- d) Hemoglobina glicada A1c (HbA1c) $\geq 6.5\%$.

Para o diagnóstico de diabetes é aconselhável usar um só parâmetro. No entanto, se houver uma avaliação simultânea da glicemia em jejum e da HbA1c, e se ambos forem valores de diagnóstico, este fica confirmado, mas se um for discordante, o parâmetro alterado deve ser repetido numa segunda análise. A utilização da HbA1c no diagnóstico da diabetes é seguida pela *American Diabetes Association* (ADA), tendo a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomendado a sua utilização, conforme relatório de 2011 *“Use of Glycated Haemoglobin (HbA1c) in the Diagnosis of Diabetes Mellitus”* ⁹. No entanto, este grupo de peritos considera

insuficiente fazer uma avaliação com base na HbA1c, não se podendo excluir a existência de diabetes para um valor de HbA1c inferior a 6.5%.

Em relação ao diagnóstico da hiperglicemia intermédia ou identificação de categorias de risco aumentado para diabetes, este faz-se com base nos seguintes parâmetros ⁸:

- a) AGJ: glicemia em jejum ≥ 110 e < 126 mg/dl (ou ≥ 6.1 e < 7.0 mmol/l);
- b) TDG: glicemia às 2 horas na PTGO ≥ 140 e < 200 mg/dl (ou ≥ 7.8 e < 11.1 mmol/l).

O diagnóstico da DG baseia-se nos seguintes valores ⁸:

- a) Glicemia em jejum, a realizar na primeira consulta de gravidez, ≥ 92 mg/dl e < 126 mg/dl (ou ≥ 5.1 e < 7.0 mmol/l);
- b) Se glicemia em jejum < 92 mg/dl, realiza-se PTGO com 75 g de glicose, às 24-28 semanas de gestação. É critério para diagnóstico de DG, a confirmação de um ou mais valores: (1) às 0 horas, glicemia ≥ 92 mg/dl (ou ≥ 5.1 mmol/l); (2) à 1 hora, glicemia ≥ 180 mg/dl (ou ≥ 10.0 mmol/l); (3) às 2 horas, glicemia ≥ 153 mg/dl (ou ≥ 8.5 mmol/l).

1.4. Classificação

1.4.1. Diabetes Mellitus tipo 1

A DM tipo 1, anteriormente designada “diabetes insulínica dependente” ou “diabetes juvenil”, corresponde a cerca de 5 a 10% de todos os casos de diabetes, e resulta de uma destruição autoimune das células β dos ilhéus de *Langerhans* do pâncreas responsáveis pela produção de insulina ^{4,10}. Assim, a insulino-terapia é indispensável para a sobrevivência destes doentes. Os marcadores desta destruição autoimune são um conjunto de anticorpos (anticorpos anti ilhéus de *Langerhans*, anticorpos anti-insulina, anticorpos antidescarboxilase do ácido glutâmico e anticorpos antitirosina fosfatase IA2 e IA-2 β) que podem estar presentes em 85 a 90% dos doentes - diabetes tipo 1 autoimune ^{4,10}. No entanto, nalguns casos não se consegue documentar este processo autoimune - diabetes tipo 1 idiopática. A DM tipo 1 é mais frequente na infância e adolescência, contudo pode surgir em qualquer idade. Frequentemente estes doentes não são obesos e têm uma predisposição para patologias autoimunes: doença de Graves, tiroidite de Hashimoto, doença de Addison, vitiligo, hepatite autoimune, miastenia gravis, anemia perniciosa e doença celíaca ⁴.

1.4.2. Diabetes Mellitus tipo 2

A DM tipo 2 corresponde a cerca de 90 a 95% dos doentes diabéticos ⁴. Anteriormente designada por “diabetes não-insulinodependente”, uma vez que na maioria dos casos os doentes não necessitam de insulina para sobreviverem; ou “diabetes do adulto” pela sua idade de início característica ser na idade adulta ⁴. Este tipo de DM é caracterizada por uma resistência à insulina e pela sua relativa deficiência. As suas etiologias não são ainda bem conhecidas, sabe-se no entanto, que não existe uma destruição celular autoimune e que a maioria dos doentes são obesos ou têm um perímetro abdominal aumentado, conferindo esta obesidade uma certa resistência à insulina ^{4,10}. Este tipo de DM tem um diagnóstico tardio uma vez que a hiperglicemia se desenvolve de forma gradual e ligeira, não originando sintomas clássicos de diabetes. O risco de desenvolver DM tipo 2 aumenta com a idade, obesidade, sedentarismo, em mulheres que tiveram DG e em indivíduos com hipertensão arterial (HTA) e/ou dislipidemia. Estes doentes estão em risco de desenvolver outras complicações macro e microvasculares. Existe ainda, uma maior predisposição genética que na DM tipo 1, no entanto, não se conhecem de forma clara e definida os genes envolvidos ^{4,10}.

1.4.3. Diabetes Mellitus gestacional

A DG corresponde a qualquer grau de intolerância à glicose documentado, pela primeira vez, durante a gravidez ⁸.

1.4.4. Outros tipos específicos de Diabetes Mellitus

Os outros tipos específicos de diabetes correspondem a situações em que a diabetes é consequência de um processo etiopatogénico identificado ^{4,10}:

- a) defeitos genéticos da célula β ;
- b) defeitos genéticos na ação da insulina;
- c) doenças do pâncreas exócrino;
- d) endocrinopatias diversas;
- e) diabetes induzida por químicos ou fármacos;
- f) infeções;
- g) outras síndromes genéticas associadas a diabetes;
- h) formas raras de diabetes imuno-mediada.

1.5. Complicações

1.5.1. Complicações microvasculares

1.5.1.1. Retinopatia diabética

A Retinopatia Diabética (RD) é a complicação microvascular mais comum ¹¹. O risco de desenvolver RD ou qualquer outra complicação microvascular da DM depende da duração da doença e da gravidade da hiperglicemia. Na DM tipo 2 a RD pode começar a desenvolver-se muito precocemente, até cerca de 7 anos antes do diagnóstico ¹¹. A prevalência, incidência, fisiopatologia, classificação, fatores de risco e diagnóstico desta complicação serão discutidos em capítulo posterior.

1.5.1.2. Nefropatia diabética

A nefropatia diabética é a principal causa de insuficiência renal nos EUA, e é definida por proteinúria > 500 mg/24h num doente diabético, no entanto pode ser precedida por graus menores de proteinúria ou microalbuminúria. A microalbuminúria é definida como a excreção de albumina de 30-299 mg/24h. A incidência de microalbuminúria é de 2% por ano nos doentes diabéticos tipo 2 e a prevalência aos 10 anos após o diagnóstico é de 25%, para além disso cerca de 7% têm valores elevados de microalbuminúria aquando do diagnóstico de DM ^{12,13}. Na DM tipo 1 a incidência cumulativa é de 12% durante um período de 7 anos ¹⁴.

As alterações patológicas a nível renal incluem principalmente o espessamento da membrana basal glomerular, formação de microaneurismas e de nódulos mesangiais (nódulos de *Kimmelsteil-Wilson*). O mecanismo fisiopatológico é muito semelhante ao da RD, abordado em capítulo posterior 2.3.

1.5.1.3. Neuropatia diabética

Segundo a ADA a neuropatia diabética é definida como a presença de sintomas e/ou sinais de disfunção do sistema nervoso periférico em doentes diabéticos após a exclusão de outras causas ¹⁵. O mecanismo através do qual a hiperglicemia crónica origina lesão dos nervos periféricos ainda não é totalmente conhecido, no entanto, muito provavelmente encontra-se relacionado com a ativação da via dos polióis, aumento dos produtos finais de glicosilação avançada (AGEs, do inglês *Advanced Glycation End-products*) e stress oxidativo. A neuropatia diabética pode manifestar-se de diferentes formas: sensorial, focal ou multifocal e neuropatia autonómica ¹⁵.

A polineuropatia sensoriomotora, crónica, distal e simétrica é a forma mais comum de neuropatia nos diabéticos. Neuropatias sensoriais puras sem sinais de neuropatia motora também podem ocorrer mas são mais raras e associadas a períodos de mau controlo metabólico

ou a flutuações deste mesmo controlo ¹⁶. As mononeuropatias tipicamente têm início súbito e são mais comuns no nervo mediano, ulnar e radial embora possam afetar qualquer nervo periférico. Amiotrofia diabética pode ser uma manifestação de mononeuropatia diabética e é caracterizada por dor severa com fraqueza muscular e atrofia, afetando principalmente os grandes músculos das coxas. A neuropatia autonómica diabética é responsável pela disfunção neurológica que ocorre em vários órgãos e pode manifestar-se como gastroparésia, obstipação, diarreia, anidrose, disfunção vesical e erétil, taquicardia e isquémica silenciosa ¹⁶.

Não existe tratamento eficaz para a neuropatia diabética no entanto a sua prevenção através do controlo metabólico deve ser preconizada.

1.5.2. Complicações macrovasculares

Na doença macrovascular o principal mecanismo patogénico é a aterosclerose resultante de inflamação crónica e consequente lesão da parede arterial do sistema vascular coronário e periférico. A DM está associada a um maior risco de doença cardiovascular (DCV). No entanto, o mecanismo responsável pelo aumento da probabilidade da formação de placa aterosclerótica nos diabéticos ainda não está completamente definido. A DCV é a principal causa de morte nos doentes com DM tipo 1 ou tipo 2 ^{17,18} e é a maior componente de despesas de saúde nestes doentes ^{18,19}. Desde o estudo de Framingham que apareceram vários trabalhos a associar a DM à doença cardíaca coronária ²⁰. Para além disso, nos doentes diabéticos tipo 2 a síndrome metabólica que se associa obesidade abdominal, HTA, dislipidemia e hipercoagulabilidade, é uma característica comum e um fator de risco acrescido para o desenvolvimento de DCV ²¹. Apesar de todos estes fatores de risco a DM atua como fator de risco independente para o desenvolvimento de doença isquémica, enfarte e/ou morte. A DM tipo 2, o sexo feminino e a presença de doença microvascular são preditores para eventos coronários ²².

A DM é também um fator de risco para doença cerebrovascular. Os doentes diabéticos tipo 2 têm um risco de 150 a 400% de desenvolver um acidente vascular cerebral (AVC) ²³.

O estudo prospetivo *Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Study* demonstrou que o tratamento intensivo da DM tipo 1 estava associado a uma redução de 42% do risco de eventos cardiovasculares e de 57% de enfarte do miocárdio não fatal, AVC e/ou morte por DCV ²⁴. Também para a DM tipo 2 diferentes estudos são concordantes no controlo metabólico glicémico, tensional e lipídico para uma menor taxa de eventos cardio e cérebro vasculares ^{25,26}.

2. RETINOPATIA DIABÉTICA

2.1. Epidemiologia e impacto socioeconómico

Dos 415 milhões de pessoas com DM a nível mundial em 2015, mais de um terço irá desenvolver alguma forma de RD ao longo da vida. Os dados da *International Diabetic Federation* dão-nos ainda a informação de que mais de 93 milhões de pessoas atualmente sofrem de algum tipo de patologia ocular relacionada com a diabetes ⁵. A RD é a principal causa de novos casos de cegueira legal entre os americanos em idade de trabalhar. A prevalência de RD em adultos com mais de 40 anos, nos EUA, é de 3.4% (4.1 milhões de pessoas), sendo a prevalência de retinopatia que ameaça a visão de 0.75% (899 mil pessoas). Assumindo uma prevalência semelhante de DM, os números projetados em 2020 seriam de 6 milhões de pessoas com RD e 1.34 milhões de pessoas com possível cegueira por RD ^{27,28}.

Em Portugal, o estudo RETINODIAB que consistiu na avaliação do programa de rastreio da RD na Região de Saúde de Lisboa e Vale do Tejo, implementado entre julho de 2009 e outubro de 2014, englobou 52 739 doentes diabéticos tipo 2 acima dos 40 anos e identificou uma prevalência de RD de 16.3%, isto é, 8584 doentes ²⁹. Destes 5484 (10.4%) tinham RD não proliferativa (RDNP) ligeira, 1457 (2.8%) tinham RDNP moderada, 672 (1.3%) apresentavam RDNP grave, 971 (1.8%) foram identificados como tendo RD proliferativa (RDP) e 732 (1.4%) doentes tinham maculopatia. Para além destes valores uma forte associação foi encontrada entre a presença de RD e a duração da DM, assim como com a idade mais jovem dos doentes ²⁹. Doentes acima dos 70 anos tinham duas vezes menor risco de desenvolver RD que os doentes com DM diagnosticado abaixo dos 50 anos. De salientar assim, a importância da deteção precoce da RD e o envolvimento dos doentes nos programas de rastreio nacionais.

Esta prevalência de RD identificada na população portuguesa é ligeiramente inferior às descritas nos estudos epidemiológicos de outros países europeus ³⁰⁻³⁴. No entanto, estes estudos não são uniformes quanto à seleção de doentes e quanto aos seus critérios de inclusão (idade, género, duração da DM, tipo da DM, comorbilidades e classificação da RD) daí ser difícil a sua comparação. Para além disso, o RETINODIAB englobou somente doentes com o estado fundoscópico dos seus olhos desconhecido, enquanto os outros estudos incluíram doentes que poderiam já ter o diagnóstico de RD.

O estudo RETINODIAB avaliou ainda a incidência e a progressão para RD em doentes diabéticos tipo 2, na Região de Saúde de Lisboa e Vale do Tejo, analisando 109 543 retinografias de 56 903 doentes ³⁵. Um total de 30 641 doentes (53.85%) teve pelo menos mais do que um episódio de rastreio durante o período do estudo (julho de 2009 a dezembro de 2014) e foram incluídos na

análise de progressão da RD. Assim, foi identificada uma incidência de RD de 4.60% no primeiro ano e de 3.87% no quinto ano, com uma incidência cumulativa aos 5 anos de 14.47%. A taxa de progressão para RDP nos doentes com RDNP ligeira no primeiro ano foi de 1.18% e de 0.52% no quinto ano com uma incidência cumulativa de 4.59% aos 5 anos. A incidência de retinopatia diabética referenciável (RDR), ou seja, todos os doentes com RDNP moderada ou grave, RDP com ou sem maculopatia e RDNP com maculopatia, foi de 0.23% no primeiro ano e de 0.34% no quarto ano com uma taxa de incidência cumulativa de 1.37%. Mais uma vez esta análise verifica que o risco de qualquer grau de RD, RD não referenciável ou RDR foi fortemente associado com o aumento da duração da DM e com a idade mais precoce aquando do diagnóstico ³⁵. Comparando estes resultados com os de outros estudos epidemiológicos de coorte europeus verificamos que os valores são similares. No entanto, existe, novamente, uma grande variabilidade entre os diferentes estudos devido a diferenças étnicas populacionais e a diferentes modos de classificar a RD, tornando a comparação limitada. No estudo epidemiológico de Wisconsin, Klein *et al.* identificaram, em doentes diabéticos tipo 1, uma taxa de progressão cumulativa de RD aos 25 anos de 83% ³⁶. Reportaram, ainda, uma progressão para RDP de 42% e uma melhoria da RD de 18%. A incidência cumulativa final para o edema macular foi de 29% e para o edema macular clinicamente significativo foi de 17%. O estudo Liverpool *Diabetic Eye Study*, que incluiu 20 570 rastreios efetuados entre 1991 e 1999, identificou uma incidência anual de RDR de 0.2% no primeiro ano, e uma incidência cumulativa de 1.7% aos 4 anos ³⁷. No país de Gales, Thomas *et al.* incluíram 57 199 pessoas com diabetes tipo 2, ao longo de um período de 4 anos e reportaram uma incidência cumulativa de RD e de RDR a 4 anos de 360.27 e 11.64 por 1000 pessoas, respetivamente ³⁸.

2.2. Fisiopatologia

A RD é uma doença multifatorial, de patogénese complexa e com pormenores ainda por esclarecer. Fatores genéticos, a hiperglicemia crónica e fatores sistémicos como a hipertensão e a hiperlipidemia contribuem para esta patologia multifatorial ^{39,40}. Diferentes células da retina estão envolvidas neste processo, desde células gliais de Müller, células ganglionares, endoteliais, fotorreceptores e células do epitélio pigmentado da retina (EPR).

As alterações microvasculares características da RD são o hiperpermeabilidade e a obstrução capilar responsáveis pelo edema macular e neovascularização retiniana, respetivamente.

A hiperglicemia crónica é o principal fator implicado nas alterações estruturais e funcionais da RD. Caracteristicamente na RD surge perda dos pericitos assim como disfunção e apoptose das

células endoteliais dos capilares retinianos com consequente hiperperfusão capilar, rutura da barreira hemato-retiniana (BHR) interna, formação de microaneurismas, oclusão capilar e hiperpermeabilidade vascular ^{39,41}. A apoptose das células endoteliais origina ainda a formação de capilares acelulares que facilmente ocluem provocando isquemia, que origina a libertação de citocinas e fatores de crescimento que estimulam a angiogénese.

Um conjunto de vias bioquímicas que se interligam têm sido propostas como potenciais conexões entre a hiperglicemia e o desenvolvimento da RD ⁴². Estas incluem a formação de AGEs, aumento da via dos polióis, ativação da proteína quinase C (PKC), expressão aumentada dos fatores de crescimento, alterações hemodinâmicas, stress oxidativo, ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAA) e inflamação subclínica e leucostase.

O excesso de glicose leva à formação de AGEs através da reação não enzimática de Maillard ⁴³⁻⁴⁵. Os AGEs e os seus recetores implicados no desenvolvimento de RD promovem o aumento dos processos inflamatórios e neurodegenerativos ⁴⁶. Para além disso a hiperglicemia ativa a via metabólica da aldose-redutase, resultando num aumento dos polióis ⁴⁷ e de stress oxidativo com consequente lesão celular ⁴⁸. Os AGEs estão ainda implicados na ativação da PKC que terá um efeito cascata em várias outras vias as quais originam hiperpermeabilidade endotelial, alterações hemodinâmicas e expressão de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*), ativação e adesão leucocitária (leucostase) ⁴⁹⁻⁵¹.

O sistema RAA é um sistema endócrino com importante papel no controlo da pressão arterial e no equilíbrio hidroeletrólítico ⁵². Nos doentes diabéticos com RDP existe uma concentração aumentada de renina, enzimas de conversão da angiotensina I e II e recetores de angiotensina ^{52,53}. Estudos *in vitro* sugerem que a angiotensina II está envolvida na ativação da PKC bem como na sinalização dos VEGFs ⁵⁴.

Existe um número de fatores de crescimento associados ao desenvolvimento da RD, os quais incluem o fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF, do inglês *Basic Fibroblast Growth Factor*), o fator-1 de crescimento insulina like (IGF-1, do inglês *Insulin-like Growth Factor 1*), angiopoietina-1 e -2, fator-1 derivado do estroma, fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento transformador beta 2, fatores de crescimento derivados das plaquetas, VEGF e eritropoietina ⁵⁵⁻⁶⁶. O fator VEGF é o mais bem estudado conhecendo-se 4 formas de homodímeros moleculares ⁶⁵. O VEGF promove a angiogénese, hiperpermeabilidade vascular e isquemia retiniana, com rutura da BHR, estimulação do crescimento de células endoteliais e neovascularização ^{67,68}. No entanto, existem estudos que sugerem que a ação do IGF-1 na promoção da neovascularização é controlada pelo VEGF ⁶⁹. Para além disso, o VEGF tem um

papel como fator de sobrevivência dos neurónios retinianos, pelo que, apesar dos anti-VEGFs serem terapêuticas efetivas, não o são em todos os doentes ⁷⁰.

A hiperglicemia crónica resulta ainda na ativação das espécies reativas de oxigénio as quais contribuem para a progressão da RD por lesão das células retinianas e resistência a uma reversão da RD mesmo após bom controlo metabólico ⁷¹.

Estes mecanismos fisiopatológicos descritos resultam numa resposta inflamatória marcada ⁴⁰ que adquire um papel importante no desenvolvimento da RD ⁷²⁻⁷⁴. Enquanto a hiperglicemia, o stress oxidativo, a formação dos AGEs e a hipertensão contribuem para a inflamação, a própria resposta inflamatória *per si* atua em cascata através da libertação de citocinas, expressão de moléculas de adesão, de recetores dos AGEs e vias de sinalização do VEGF, alterações na regulação do óxido nítrico e sinalização do fator de transcrição nuclear kapa B. A inflamação subclínica retiniana pode ainda originar aumento da pressão sanguínea intraocular via sintetase do óxido nítrico (NOS, do inglês *Nitric Oxide Synthase*), formação de neovasos e aumento da permeabilidade vascular e leucostase devido ao *cross talk* entre vários fatores proinflamatórios.

O *coupling* neurovascular refere-se à relação entre a atividade neuronal local e as alterações no fluxo sanguíneo, ou seja, corresponde a um processo no qual o tecido neuronal regula o seu fluxo sanguíneo em resposta à atividade neuronal. Na retina, há uma ligação significativa entre a atividade neuronal de células ganglionares da retina (ou, pelo menos, da retina interna) e o fluxo de sanguíneo ⁷⁵⁻⁷⁷. Alterações no *coupling* neurovascular e na regulação cerebrovascular têm sido propostas como papel-chave no processo de envelhecimento, assim como na patogénese do AVC, dislipidemia, hipertensão e DM ⁷⁸. Evidências clínicas continuam a apoiar a premissa de que a doença vascular retiniana é em grande parte a responsável pela perda de visão nos doentes diabéticos. No entanto, a função neuronal é um importante regulador da função vascular normal, e perturbações nesta interação celular podem ter efeitos adversos na função ou estrutura da retina (Figura 1). Apoiando esta noção de que a retina não é só uma unidade vascular mas sim uma unidade neurovascular surgiram vários estudos considerando que antes do aparecimento dos microaneurismas há lesão das células não vasculares da retina (células ganglionares, células gliais e microgliais, e fotorreceptores) ⁷⁹⁻⁸³. Os três principais mecanismos do processo neurodegenerativo que ocorre na RD são: (1) acumulação de glutamato extracelular; (2) stress oxidativo; e (3) redução da síntese de fatores neuroprotetores pela retina, tais como fator derivado do epitélio pigmentado, somatostatina e eritropoietina. O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório e que se encontra em concentrações elevadas nos modelos experimentais de diabetes ^{84,85} assim como no vítreo de doentes com RDP ⁸⁶. Este excesso de glutamato extracelular origina uma hiperativação dos seus recetores

ionotrópicos, recetores N-metil D-Aspartato (NMDA) e alfa-amino3-hidroxi5-metil4-isoxazol-propiónico (AMPA), resultando numa resposta intracelular de cálcio descontrolada a nível dos neurónios pós-sinápticos e consequente morte celular. Este efeito deletério do glutamato nos neurónios retinianos é designado por excitotoxicidade ⁸⁷.

Assim outro mecanismo fisiopatológico importante na RD é a disfunção neuronal ⁴⁰ e a RD é assumida como uma doença neurodegenerativa antes de uma doença vascular.

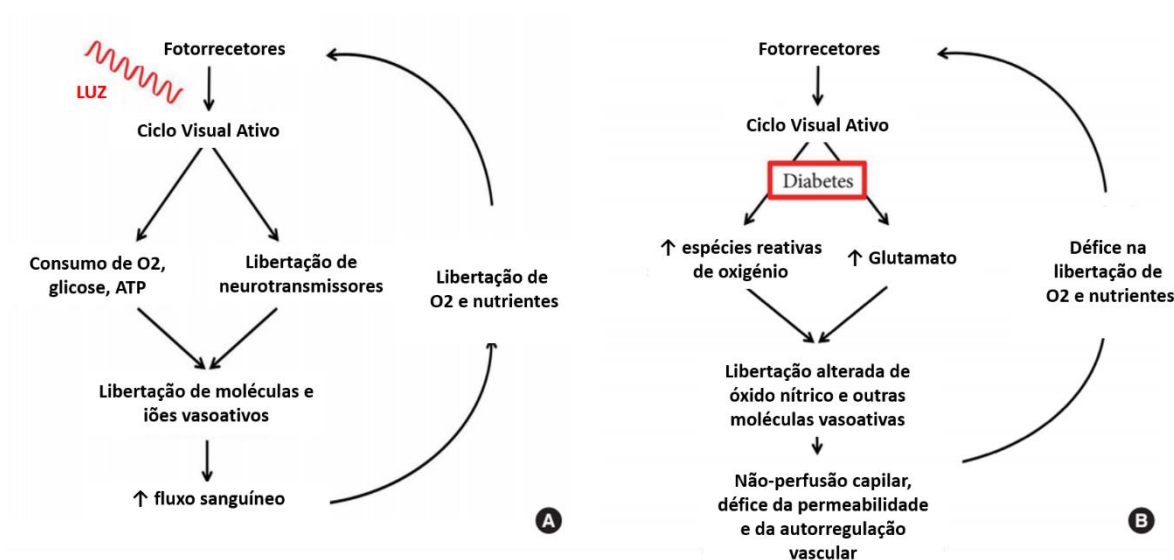


Figura 1 - Comparação das interações neuronais e vasculares em condições não diabéticas (A) e condições diabéticas (B). Normalmente, o metabolismo neuronal influencia a entrega de sangue aos tecidos neurais, e o aumento do fluxo sanguíneo local após o aumento da atividade neuronal mantém a interação entre esses dois compartimentos. Na diabetes, tanto a sinalização neuronal para a vasculatura, e a entrega de nutrientes para a retina encontra-se prejudicada. (figura adaptada com permissão do Prof. Dr. Bonnet Fabrice, Kern TS. *Interrelationships between the retinal neuroglia and vasculature in diabetes*. *Diabetes Metab J*. 2014;38(3):163-170 ⁷⁸).

Em resumo, a fisiopatologia da RD é complexa sendo a hiperglicemia crónica e sustentada o fator *ab initio* mais implicado, originando alterações inflamatórias e reações bioquímicas com consequências neuronais e vasculares.

2.3. Classificação

Ao longo dos tempos várias classificações internacionais para a RD têm sido propostas, de forma a tornar mais fácil e objetiva a comunicação entre a comunidade científica.

A primeira descrição da RD remonta a Eduard Jäger em Graz, Áustria, em 1856 poucos anos depois da introdução do oftalmoscópio ⁸⁸. Em 1890 seguiram-se as clássicas descrições de Julius Hirschberg de lesões retinianas (*retinitis centralis punctuate, haemorrhagic form, retinal infarction e haemorrhagic glaucoma*) que poderiam ser sequelas de hipertensão arterial e/ou de aterosclerose ⁸⁹. A questão foi negligenciada até às descrições de Ballantyne ⁹⁰, Ashton ⁹¹ e Cogan ⁹² que documentaram a especificidade da RD.

Em 1968 um grupo de peritos reuniu-se num simpósio organizado por Goldberg e Fine, no *Airlie House Conference Center* na Virgínia, EUA, para discutir o que se sabia até então sobre a RD ⁹³. Deste simpósio resultou uma importante classificação da RD: a retinopatia diabética não proliferativa e a retinopatia diabética proliferativa. Um subgrupo designado por retinopatia diabética pré-proliferativa foi ainda criado, englobando os olhos com dilatações venosas, manchas algodinosas, anomalias microvasculares intraretinianas (IRMAs, do inglês *Intraretinal Microvascular Abnormalities*) e hemorragias intrarretinianas extensas, que estavam em risco elevado de desenvolver RDP.

Esta classificação de Airlie House foi modificada no *Diabetic Retinopathy Study* (DRS) ⁹⁴. Resumidamente a classificação modificada é baseada na análise de pares estereoscópicos de fotografias coloridas da retina tiradas em 7 campos do fundo ocular, cada uma cobrindo 30 graus. Mais tarde esta mesma classificação foi ainda modificada no *Early Treatment of Diabetic Retinopathy Study* (ETDRS) ⁹⁵. A classificação ETDRS tornou-se a classificação *gold standard* durante vários anos:

1. Sem RD – score 10;
2. RDNP ligeira – score 20 a 35;
3. RDNP moderada a grave – score 43 a 53;
4. RDP – score ≥ 61 .

A classificação de ETDRS veio acrescentar a entidade clínica edema macular clinicamente significativo (EMCS) que corresponde a pelo menos um dos três achados clínicos ⁹⁵: (1) espessamento da retina numa área de até 500 μm centrada na fóvea; (2) exsudados duros associados a espessamento da retina numa área de até 500 μm centrada na fóvea; ou (3) uma área de pelo menos um disco ótico de diâmetro de espessamento da retina estando pelo menos uma parte dela incluída numa área de um disco de diâmetro centrada na fóvea.

Esta classificação de ETDRS é uma classificação muito usada entre a comunidade científica em diferentes ensaios clínicos, no entanto, é complexa para a sua utilização na prática clínica ^{95,96}.

Outros autores classificaram o edema macular diabético (EMD) em focal ou difuso de acordo com o padrão de difusão observado na angiografia fluoresceínica (AF) ⁹⁷. A angiografia veio ainda permitir a identificação da entidade edema macular cistoide definido como o espessamento da retina macular com aspeto de cavidades intrarretinianas visíveis à fundoscopia e com aspeto petaloide evidente nas fases tardias da angiografia. Associado a este edema macular pode coexistir maculopatia isquémica, definida na AF como oclusão dos capilares maculares com alargamento da área avascular central superior a duas vezes o seu diâmetro normal (350-750 µm). Com o aparecimento da tomografia de coerência ótica (OCT, do inglês *Optical Coherence Tomography*) houve novas tentativas de classificar o EMD, no entanto não foi aprovado nenhum sistema de classificação que integre os dados da clínica, AF e OCT com as opções terapêuticas para os diferentes tipos de EMD. Recentemente, o *EVICR.net Study* propôs uma classificação do EMD tendo em conta a espessura retiniana total dos anéis internos e externos maculares representados no OCT ⁹⁸.

Em 2002 foi elaborada uma classificação para a RD com base na observação do fundo ocular/retinografia que propõe uma escala de risco/gravidade para a RD, sendo hoje a classificação usada na prática clínica – Classificação Clínica Internacional ⁹⁹ (Tabela 1). Esta classificação foi baseada nos achados dos estudos *Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy* (WESDR) ^{100,101} e ETDRS.

Tabela 1 - Classificação Clínica Internacional da retinopatia diabética / Graus de gravidade da retinopatia diabética (GDRPG - Global Diabetic Retinopathy Project Group 2002)

Classificação da RD / Grau de gravidade	Sinais fundoscópicos
Sem RD	Sem alterações
RDNP ligeira	Apenas microaneurismas
RDNP moderada	Mais do que apenas microaneurismas mas menos do que RDNP grave
RDNP grave (se em vez de “ou” se considerar “e” podemos considerar RDNP muito grave)	Qualquer um dos seguintes: - mais do que 20 hemorragias intrarretinianas em cada um dos 4 quadrantes - anomalias venosas (<i>venous beading</i>) em 2 ou mais quadrantes - IRMAs em pelo menos um quadrante - sem sinais de RDP
RDP	Neovascularização e/ou hemorragia vítrea/pré-retiniana

RD - Retinopatia Diabética, RDNP - Retinopatia Diabética Não Proliferativa, RDP - Retinopatia Diabética Proliferativa, IRMAs - *Intraretinal Microvascular Abnormalities*.

Atualmente a Classificação Clínica Internacional baseia-se somente nos achados microvasculares visíveis à fundoscopia, não incluindo parâmetros estruturais retinianos como alterações das espessuras das diferentes camadas da retina¹⁰⁰. Diferentes estudos histológicos, *post mortem* e clínicos identificaram alteração destes parâmetros estruturais mesmo antes das alterações vasculares fundoscopicamente visíveis, apoiando o conceito de uma nova fase precoce da RD, enquanto doença neurodegenerativa, antes da RDNP ligeira^{82,102}.

Em dezembro de 2009, o Grupo de Estudos da Retina (GER) e o Grupo Português de Retina - Vítreo da Sociedade Portuguesa de Oftalmologia (SPO), consideraram que existindo RDP esta deve ser classificada de acordo com a sua gravidade¹⁰³ (Tabela 2).

Tabela 2 - Classificação da retinopatia diabética proliferativa

RDP	Apresentação clínica
RDP baixo risco	Neovascularização (NV) do disco ótico (DO) – no DO ou dentro de 1 diâmetro de disco (1 DD) mas com área < 1/3 do DD ou neovasos para além de 1 DD mas com área < ½ DD
RDP alto risco	NV do DO - no DO ou dentro de 1 DD mas com área ≥ 1/3 do DD ou NV para além de 1 DD mas com área ≥ ½ DD ou critérios de baixo risco associados a pequena hemorragia vítrea ou sub-hialoideia
RDP com doença ocular diabética avançada	Qualquer um dos seguintes: - hemovítreo/hemorragia sub hialoideia; - rubeosis da íris; - descolamento de retina tracional; - proliferação fibrovascular com ± tração.

RDP - Retinopatia Diabética Proliferativa.

A Classificação Clínica Internacional ainda classifica o EMD⁹⁹ (Tabela 3).

Tabela 3 - Classificação Clínica Internacional do edema macular diabético / Graus de gravidade do edema macular diabético (GDRPG - Global Diabetic Retinopathy Project Group 2002)

Classificação / Grau EMD	Sinais encontrados
EMD aparentemente ausente	Sem espessamento aparente da retina ou exsudados duros
EMD aparentemente presente	Algum espessamento retiniano ou exsudados duros no polo posterior
- EMD ligeiro	Algum espessamento retiniano ou exsudados duros no polo posterior mas distantes do centro da mácula
- EMD moderado	Espessamento retiniano ou exsudados duros aproximando-se do centro da mácula mas não o atingindo
- EMD grave	Espessamento retiniano ou exsudados duros atingindo o centro da mácula

EMD – Edema Macular Diabético.

2.4. Fatores de risco

A duração da diabetes é o fator de risco *major* associado ao desenvolvimento de RD. Após 5 anos de DM, cerca de 25% dos doentes diabéticos tipo 1 têm RD, sendo este valor de 60 e 80% após 10 e 15 anos, respetivamente ^{101,104}. O WESDR identificou que cerca de 50% dos doentes diabéticos tipo 1 com 20 anos de duração da diabetes tinham RDP ¹⁰¹. Nos doentes diabéticos tipo 2 com o diagnóstico há menos de 5 anos, a prevalência da RD foi de 40% nos insulíndependentes e 24% nos não insulíndependentes. Estes valores atingem os 84 e 53%, respetivamente, ao fim de 20 anos de DM. A RDP desenvolve-se em 2% dos doentes com DM tipo 2 há menos de 5 anos, mas aumenta para 25% quando estamos perante doentes com 25 anos ou mais de duração da doença ¹⁰⁵. No estudo *Liverpool Diabetic Eye Study* (LDES), não só a duração da DM mas também o tipo de tratamento foram associados à incidência da RD ^{37,106}. Na DM tipo 1, a presença de RD é muito rara no momento do diagnóstico no entanto, a sua incidência é de 90%, após 15 anos de evolução. No caso da DM tipo 2, a RD está presente em 20% dos casos, aquando do diagnóstico e após 15 anos de duração a sua prevalência é de cerca de 60% ¹⁰¹.

A hiperglicemia é o principal fator de risco modificável associado à incidência e progressão para RD, sendo desta forma, alvo de vários estudos epidemiológicos ^{18,24,107-114}. Há um consenso geral de que a duração da DM e a hiperglicemia são os dois fatores de risco principais para o desenvolvimento de RD. No entanto, a hiperglicemia crónica é uma variável independente da duração da doença e do grau de RD ^{115,116}. Uma vez estabelecido o diagnóstico de RD a duração da doença parece ser um fator menos importante do que a hiperglicemia para a progressão da RD. O estudo *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT) que incluiu 726 doentes diabéticos sem RD aquando do primeiro rastreio (a coorte de prevenção primária) e 715 doentes diabéticos com RDNP ligeira a moderada (coorte de intervenção secundária), demonstrou que um bom controlo metabólico (HbA1c de 7.2%) permitiu uma redução de 76% no desenvolvimento de RD e de 60 e 54% no desenvolvimento de neuropatia e nefropatia, respetivamente ¹¹⁷. O DCCT identificou também uma taxa de incidência de RD de 12%, no grupo com terapêutica intensiva (HbA1c de 7.2 %) *versus* 54% no grupo sob terapêutica convencional (HbA1c de 9.1%). No grupo de intervenção secundária, a terapêutica intensiva atrasou a progressão de RDNP ligeira para moderada (terapêutica intensiva - 25% *versus* terapêutica convencional - 53%). Outro resultado a destacar deste estudo é o fato de que no grupo sob controlo metabólico intensivo houve um agravamento precoce da RD em 13.1% dos doentes, entre os 6 e os 12 meses, e de 7.6% no grupo sob tratamento convencional ¹¹⁷. Quando há um controlo metabólico rápido, num curto intervalo de tempo, o aumento de fatores como IGF-1, pode estar associado a este agravamento

da RD ¹¹⁸. O *Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications* (EDIC) em que os doentes do DCCT foram seguidos até 18 anos verificou que a taxa de progressão da RD continuava a ser menor no grupo sob tratamento intensivo. No entanto, a redução no risco de progressão para RD foi diminuindo ao longo do *follow up*, o DCCT identificou uma redução de 73% do risco de progressão da RD e o EDIC após 4 anos verifica uma redução de 74% que diminui para 59 e 43%, após 10 e 18 anos de seguimento, respetivamente ^{107,119–121}. Em relação aos doentes diabéticos tipo 2, o estudo *United Kingdom Prospective Diabetes Study* (UKPDS) verificou que um bom controlo metabólico (HbA1c de 7% *versus* 9%) associou-se a uma redução de 25% nas complicações microvasculares da DM ^{122,123}. Na DM tipo 2, a evidência científica sugere que um esforço adicional para diminuir a HbA1c para além de 7% não será benéfico clinicamente e por outro lado pode aumentar o risco cardiovascular.

No estudo WESDR, para além da duração da DM, a insulinoterapia e o mau controlo metabólico terem sido considerados fatores de risco para o desenvolvimento de RD, também a HTA sistólica e a proteinúria foram associadas à progressão da RD ¹⁰⁵. O UKPDS – *Hypertension in Diabetes Study* revelou que um bom controlo tensional (< 144/84 mmHg) permitiu reduzir em 37% as complicações microvasculares dos doentes diabéticos, em 3% a progressão da RD e em 32% as mortes relacionadas com a DM ¹²⁴.

O ETDRS identificou ainda, que níveis elevados de colesterol total e de LDL (do inglês *Low Density Lipoprotein*) se associavam a uma maior incidência de exsudados duros ¹²⁵. Outros estudos demonstraram que o tratamento da dislipidemia pode reduzir a taxa de exsudados duros, no entanto os resultados relativos à acuidade visual são incongruentes ¹²⁶. A dislipidemia é um fator de risco cardiovascular, logo é crucial o seu controlo nos doentes diabéticos.

Posteriormente o mesmo grupo do estudo WESDR vem publicar que a idade mais jovem aquando o diagnóstico da DM tipo 2 se associa a uma maior taxa de incidência e de progressão da RD.

Existem ainda outros estudos menos consensuais face a outros fatores de risco para progressão da RD, tais como a idade ¹²⁷, género ^{100,128}, obesidade ^{129,130}, nefropatia diabética ¹³¹, anemia ^{132,133} e alguns hábitos farmacológicos: inibidores da enzima de conversão da angiotensina (IECA) ²⁶, inibidores da aldolase-redutase ¹³⁴, antiagregantes plaquetários ¹³⁵ e glitazonas ^{136,137}.

O estudo DCCT verificou também que as mulheres grávidas tinham um maior risco de desenvolvimento e progressão da RD, principalmente no segundo trimestre ¹³⁸. A progressão da retinopatia na gravidez é maior nas mulheres com um grau mais avançado de RD no momento da conceção.

Vários destes fatores estão associados a morbidade e mortalidade de causa cardiovascular e a outras complicações da DM, pelo que é importante ensinar e encorajar o doente diabético a ter um bom controlo sistémico, e não só glicémico, assim como um estilo de vida saudável.

2.5. Manifestações clínicas

Até à data, tal como a Classificação Clínica Internacional da RD define, o diagnóstico clínico de RD estabelece-se quando são detetadas lesões retinianas visíveis à fundoscopia.

Os estadios não proliferativos da RD são caracterizados pela presença de alterações vasculares retinianas como microaneurismas, hemorragias intraretinianas, dilatações venosas e exsudados moles ¹³⁹. Os microaneurismas são o sinal mais precoce da RD e correspondem a dilatações focais das paredes dos capilares retinianos por perda dos seus pericitos. A rutura destes microaneurismas origina hemorragias retinianas punctiformes ou em chama de vela conforme a sua localização mais profunda, camada nuclear interna e plexiforme externa, ou superficial na camada de fibras nervosas, respetivamente. Os exsudados moles ou manchas algodonosas são enfartes da camada de fibras nervosas resultantes da oclusão de arteríolas pré-capilares, frequentemente delimitados por hiperpermeabilidade vascular e microaneurismas ¹⁴⁰.

Quando a permeabilidade vascular retiniana aumenta por comprometimento da integridade da BHR interna, ocorre *leakage* de fluido e constituintes do plasma para o espaço intersticial adjacente. Esta situação que pode ocorrer em qualquer estadio da RD e se caracteriza por espessamento da retina (edema) e/ou formação de depósitos lipídicos, lipoproteínas plasmáticas (exsudados duros), define o edema macular diabético, ver capítulo Classificação da RD e Tabela 3 ⁹⁹.

Se a RD progredir haverá uma gradual oclusão dos vasos retinianos com défice na perfusão e consequente isquemia da retina. Os sinais clínicos de aumento desta isquemia incluem anormalidades venosas (dilatações, ansas e veias em rosário), IRMAs e *leakage* vascular mais extenso caracterizado por aumento das hemorragias e exsudação retinianas. Quando estes sinais clínicos evoluem para além de determinados limiares estamos perante RDNP grave (Tabela 1). Os IRMAs são dilatações segmentares de capilares retinianos parcialmente ocluídos localizados nas camadas mais internas da retina, ao contrário dos neovasos que têm um crescimento centrípeto em direção à cavidade vítrea.

Se a isquemia retiniana aumentar e se tornar generalizada, em resposta aos estímulos angiogénicos de mediadores vasoproliferativos, surgirá a neovascularização das camadas

internas da retina característica da RDP. Os neovasos do disco ótico ou de qualquer local da retina são vasos frágeis predispostos a rutura com consequente hemovítreo ou a fibrose e contração com resultante formação de membranas epiretinianas, bandas de tração vitreoretinianas, rasgaduras e descolamentos da retina tracionais ou regmatogéneos. Glaucoma neovascular também pode ser uma manifestação da RDP, provocado por neovasos do segmento anterior (íris ou ângulo iridocorneano).

Antes do aparecimento destas manifestações clínicas podem existir alterações nalgumas funções retinianas como perda da sensibilidade ao contraste, discromatopsia e/ou atraso no tempo de recuperação da retina quando estimulada pela luz identificadas em exames eletrofisiológicos e psicofísicos ^{141,142}. Estas alterações traduzem a possível neurodegeneração precoce presente nos doentes diabéticos sem RD clinicamente evidente.

2.6. Estratégias diagnósticas

2.6.1. Rastreio

A RD evolui muitas vezes sem sintomas visuais, surgindo estes apenas em estadios mais avançados da doença. Desta forma, é importante o rastreio e a deteção precoces que permitem tratamento em fases adequadas com diminuição do risco de cegueira por RD.

Já em 1989, a declaração de St. Vincent propunha estratégias nacionais de rastreio sistemático da RD ¹⁴³. Atualmente, de acordo com a DGS a primeira avaliação oftalmológica dos doentes diabéticos tipo 2 deve ser realizada aquando o diagnóstico e depois anualmente, caso não haja manifestações de RD, e nos doentes diabéticos tipo 1 após 5 anos do diagnóstico de DM ⁸. A ADA defende que a periodicidade da avaliação fundoscópica dos doentes diabéticos sem RD com bom controlo metabólico pode ser bianual ¹⁴⁴. A nível nacional, o manual de Boas Práticas em Oftalmologia - da responsabilidade do Professor Doutor António Castanheira-Dinis, recomenda que a deteção precoce da RD deve ser realizada através do rastreio nos novos diabéticos ou para caracterizar as alterações retinianas nos diabéticos nunca observados em oftalmologia ¹⁴⁵.

Idealmente o diagnóstico de RD deve ser realizado por um oftalmologista após observação do fundo ocular, sob midríase farmacológica, através de oftalmoscopia direta e/ou, preferencialmente, biomicroscopia com utilização de lente de ampliação que permita estereopsia. No entanto, uma vez que o volume de doentes diabéticos é elevado e para permitir o rastreio ao maior número de doentes possível, a observação fundoscópica pode ser

substituída por duas fotografias do fundo ocular obtidas por câmaras não midriáticas, com campo de 45º, sendo uma fotografia do campo 1 (centrada no DO) e outra do campo 2 (centrada na mácula). Este método tem resultados similares ao *gold standard* do rastreio da RD que consiste em fotografias de 30º nos 7 campos do estudo ETDRS^{95,146}. As retinografias são obtidas por técnico ortoptista qualificado e enviadas para oftalmologistas treinados para a sua classificação. Nos últimos anos, a era da imagem digital veio tornar a telemedicina eficaz como método de rastreio na RD. Os casos de RD, de má classificação e/ou com má qualidade da imagem são encaminhados para uma consulta especializada de Diabetes Ocular. De acordo com a Classificação Internacional de RD a avaliação oftalmológica após o diagnóstico de RD varia com o estadio em causa¹⁴⁷ (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4 - Orientação oftalmológica de acordo com a gravidade da retinopatia diabética

Classificação Internacional	Urgência da referência para tratamento
Sem RD	Avaliação anual ou antes se: adolescente, HTA, HbA1c \geq 10%, insuficiência renal
RDNP ligeira	Avaliação aos 6-9 meses ou antes se: adolescente, HTA, HbA1c \geq 10%, insuficiência renal
RDNP moderada	Consulta de Diabetes Ocular no período de 6 meses
RDNP grave	Consulta de Diabetes Ocular no período de 3 meses
RDP baixo risco	Consulta de Diabetes Ocular no período de 2 meses
RDP alto risco	Consulta de Diabetes Ocular no período de 2 semanas a 1 mês (DM tipo 1 – 1 semana)
RDP com doença ocular diabética avançada	Consulta de Diabetes Ocular e Retina Cirúrgica no período aproximado de 1 mês.

RD - Retinopatia Diabética, RDNP - Retinopatia Diabética Não Proliferativa, RDP - Retinopatia Diabética Proliferativa, HTA - Hipertensão Arterial, HbA1c - Hemoglobina Glicada, DM - Diabetes Mellitus.

Tabela 5 - Orientação oftalmológica de acordo com a gravidade do edema macular diabético

Classificação Internacional	Urgência da referência para tratamento
EM aparentemente ausente	Seguir esquema de referência da RD
EM aparentemente presente	
- Ligeiro	Consulta de Diabetes Ocular no período de 4 meses
- Moderado	Consulta de Diabetes Ocular no período de 2 meses
- Grave	Consulta de Diabetes Ocular no período < 2 meses

EM - Edema Macular, RD - Retinopatia Diabética.

O tratamento precoce da RD tem um custo muito menor em comparação com o tratamento de complicações tardias¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Diana Marques, da Universidade de Coimbra, realizou um estudo intitulado “Avaliação de Efetividade/Utilidade do Rastreio Sistemático *versus* Rastreio Ocasional

da Retinopatia Diabética: Caso Português” e verificou que o rastreio anual permite um ganho de 2.5 anos de vida sem cegueira e de 0.6 anos de vida ajustados pela qualidade face à evolução natural da doença para um doente diabético tipo 2 que inicia o rastreio aos 49 anos ¹⁵⁰.

Na consulta de Diabetes Ocular a observação é realizada no sentido de estadiar a RD e programar o seu seguimento e/ou tratamento. Assim é avaliada a melhor acuidade visual corrigida (MAVC), realizada biomicroscopia, tonometria, gonioscopia e fundoscopia após midríase farmacológica, e quando necessário AF, ecografia e/ou OCT.

Uma vez que existem um conjunto de alterações estruturais a nível da retina sugestivas do processo de neurodegeneração mais precoce que as alterações microvasculares clinicamente visíveis, é possível que num curto período de tempo a Classificação Clínica Internacional seja revista assim como a orientação oftalmológica dos doentes diabéticos sem RD. Existirão assim, doentes em maior risco de desenvolver RD do que outros conforme a fase de neurodegeneração em que se encontrem. Acredita-se hoje que o OCT terá um papel primordial nesta revisão da classificação da RD.

2.6.2. Angiografia fluoresceínica

Apesar do aparecimento de novos OCTs, a AF ainda é um exame complementar de diagnóstico imprescindível no diagnóstico de isquemia retiniana macular e periférica ou para detetar e caracterizar a origem das áreas de exsudação e/ou áreas de não-perfusão capilar num EMD focal, multifocal ou difuso, assim como quando existe diminuição da acuidade visual sem causa aparente. Pode ainda, ser realizada no contexto de RDP para avaliar a resposta de doentes submetidos a fotocoagulação pan-retiniana ou na deteção de NV retiniana subtil.

Mais recentemente, a angiografia de campo ultra-ampla de não contacto, permite filmes de AF e angiografia com verde de indocianina ao mesmo tempo de varrimentos de OCT com lentes permutáveis que estendem o campo de visão de 30º até 102º. Assim detetam-se áreas de isquemia retiniana periférica e permite-se decidir sobre o *Target Retinal Photocoagulation*, ou seja, a fotocoagulação de áreas alvo de isquemia periférica como modalidade precoce de tratamento da RDP e do EMD com componente de isquemia periférica associado, entidade que está a ser considerada como uma variante do EMD e que foi identificada pela angiografia de campo ultra-ampla ^{151,152}.

2.6.3. Ecografia

A ecografia pode ser um exame complementar de diagnóstico útil nos doentes diabéticos cuja observação fundoscópica é impossível por opacidades dos meios oculares (catarata, opacidades corneanas, hifema ou hemovítreo). Nos doentes diabéticos a principal causa de hemovítreo é a RDP, no entanto, também pode existir uma rasgadura ou descolamento da retina ou descolamento posterior do vítreo, em que o seu diagnóstico será estabelecido ou complementado pela ecografia.

2.6.4. Tomografia de coerência ótica

O OCT foi desenvolvido na década de 90, com a primeira publicação descrevendo a técnica em 1991 ¹⁵³.

O OCT é uma tecnologia de diagnóstico médico por imagem e fundamentalmente uma generalização da interferometria de baixa coerência ¹⁵⁴, sendo o interferómetro mais utilizado o interferómetro de Michelson ¹⁵⁵. O objeto de estudo é “seccionado oticamente” através do deslocamento do espelho de referência do interferómetro, e o sistema de fotodetecção recolhe a luz retro-refletida ao longo da direção de propagação do feixe incidente na amostra. O feixe ótico de baixa coerência ilumina a amostra e executa o seu seccionamento longitudinal com uma resolução espacial muito elevada (da ordem de 1 a 10 μm), de forma não-invasiva, em tempo-real e *in vivo*. Nos tecidos biológicos, o sinal interferométrico do fotodetector resulta da sobreposição da refletividade da amostra que é constituída por meios estruturados (fotões que são retro-difundidos por propagação nos tecidos) e com distribuições contínuas de centros difusores (absorção da radiação pelos tecidos). Na presença de múltiplas camadas refletoras ao longo do percurso da amostra, o varrimento do espelho de referência, com uma precisão mais fina que o comprimento de coerência, revelará conjuntos de franjas de interferência localizadas sempre que o atraso da referência sintoniza o interferómetro para cada uma das superfícies refletoras. Assim, associado a este seccionamento longitudinal o seccionamento ótico na direção transversal ao feixe sobre a amostra, permite a construção de mapas tridimensionais com resoluções longitudinais e transversais (sub)micrométricas. Daqui resulta o nome tomografia (dos termos gregos *tomos*, que significa “parte” ou secção” e *grafein* que significa “escrever”).

Há duas formas principais em que a luz refletida pode ser detetada: (1) deteção por domínio de tempo (TD, do inglês *Time Domain*); (2) deteção por domínio de Fourier (FD, do inglês *Fourier*

Domain), o qual ainda é dividido em Domínio Espectral (SD, do inglês *Spectral Domain*) e *Swept Source* (SS).

Assim, no TD-OCT, conforme descrito, a luz do braço de referência e a luz refletida a partir do tecido sofrem interferência. Esta interferência ao longo do tempo é usada para gerar uma imagem da profundidade (*A-scan*) da retina num único ponto. Movendo-se o braço da amostra e a fonte de luz, um em relação à outra, são gerados múltiplos *A-scans* que são combinados numa imagem linear transversal chamada *B-scan*. As velocidades de digitalização do TD-OCT são cerca de 400 *A-scans*/segundo.

Contudo, a necessidade de obter imagens tomográficas em “tempo-real”, implicava aumentar a velocidade de varrimento do espelho de referência e consequentemente o sistema de processamento de sinal. Na tentativa de resolver este problema obteve-se a imagem da amostra a partir do interferograma espectral (também conhecido como FD). Com esta técnica, o percurso de referência fica estático visto que a informação contida no interferograma é adquirida por detetores espectralmente separados (com uma rede de difração e uma série de fotodetetores lineares, como CCDs). Desta forma, melhorou-se a velocidade de aquisição de imagem, reduzindo as perdas óticas durante o varrimento o que por sua vez melhora a relação sinal-ruído da deteção. Uma outra variante da técnica no domínio espectral consiste em utilizar uma fonte laser sintonizável (ou de varrimento) e um fotodetector. Neste caso, a frequência ótica de emissão do laser é “varrida” ao longo de uma banda espectral larga, e os componentes espectrais deixam de ser codificados por uma separação espacial, passando a ser codificados por uma separação temporal. Pela utilização de um comprimento de onda sintonizável ao longo de toda a banda espectral de emissão, a configuração ótica torna-se mais simples do que no caso SD-OCT, visto que o problema do varrimento é transferido para a fonte ótica e não para o percurso do espelho de referência. A vantagem é a elevada relação sinal-ruído da tecnologia de fotodeteção e nas fontes de laser sintonizáveis que apresentam riscas espectrais de emissão muito estritas e conseguem frequências de varrimento altas (200 KHz). Esta técnica com fonte de laser sintonizável é geralmente designada pela sigla SS-OCT, do inglês *Swept Source Optical Coherence Tomography*.

Nas duas últimas décadas, o OCT tem sido um dos dispositivos mais utilizados tanto na prática clínica como na investigação clínica e básica.

Nos doentes diabéticos, o SD-OCT é um dos meios complementares de diagnóstico mais utilizado, por ser um exame não-invasivo, fiável, reproduzível, que nos fornece importante informação sobre: (1) diagnóstico e classificação do EMD, (2) interface vítreo-retiniana, (3)

eficácia dos tratamentos cirúrgicos, laser e/ou médicos com corticosteroides e/ou anti-VEGFs, e (4) espessura de todas as camadas da retina e coróide apoiando o diagnóstico precoce da RD enquanto doença neurodegenerativa e avaliação da coroidopatia diabética.

O EMD pode ser classificado de acordo com os aspetos morfológicos do OCT em EMD difuso ou “em esponja”, cistoide ou descolamento seroso da retina neurosensorial isolado ou associado ao edema difuso ou cistoide. Tem havido uma tentativa de correlacionar estes padrões tomográficos com os angiográficos (padrão petaloide na área foveal, padrão em favo de mel na área parafoveal e padrão difuso). O OCT permite uma avaliação mais precisa do edema macular não só de forma transversal mas também avaliando as várias camadas da retina que podem estar afetadas.

Quanto à interface vítreo-retiniana no doente diabético, esta pode ter várias alterações que comprometem a função visual, desde membranas epirretinianas a trações vítreomaculares, classificadas da seguinte forma: T0 - ausência de linha hiperrefletiva; T1 - presença de linha hiperrefletiva contínua, aderente à retina mas que não promove distorção da mesma; T2 - presença de linha hiperrefletiva com múltiplos pontos de união à superfície da retina que promove distorção da mesma; e T3 - tração anteroposterior com configuração em “asa de gaivota”.

Quanto à monitorização da resposta aos diferentes tratamentos para a RD, diferentes estudos como o RESTORE, RISE/RIDE e READ-2, utilizaram a espessura subfoveal obtida pelo OCT como *outcome* secundário, relacionado com a melhoria da acuidade visual ^{156–159}.

Recentemente diferentes algoritmos têm permitido a segmentação automática das camadas da retina, originando uma visualização *in vivo* de todas as estruturas retinianas como se de cortes histológicos se tratassem. Esta segmentação foi não só possível a nível da retina como também a nível da coróide após obtenção de imagens da mesma através do SD-OCT com o *software Enhanced Depth Imaging* (EDI) ou com o SS-OCT. Estas novas capacidades de segmentação têm sido úteis para o entendimento da patogénese da RD.

O OCT Doppler tem tido utilidade clínica na análise do fluxo sanguíneo em doentes com RD e na avaliação da arquitetura tridimensional de complexos neovasculares na RDP.

Através do OCT podemos ainda obter segmentações do plano coronal, em que, após obtenção dos *B-scans*, um *software* irá produzir *C-scans* formando uma imagem *en-face* para posterior análise. *En-face* OCT pode ser obtido através do TD, SD e SS-OCT.

Por último, a mais recente técnica de imagem do SD-OCT, a angiografia OCT (OCTA, do inglês *Optical Coherence Tomography Angiography*), que permite a visualização dos vasos retinianos e

coroideus sem injeção de corante. A técnica baseia-se no movimento dos eritrócitos nos vasos sanguíneos entre os diferentes *scans*. Na RD, a OCTA pode ser utilizada para visualizar as áreas de isquémica e sua progressão no polo posterior e média-periferia, a zona avascular foveal, tortuosidade dos vasos e *loops* capilares, microaneurismas e espaços cistoides associados ao EMD. No entanto, a AF continua a ser o *gold standard* para estudar a vasculatura retiniana *in vivo* nos doentes diabéticos, por ser um exame dinâmico que permite detetar áreas de exsudação e impregnação ao longo da sua realização.

3. COROIDOPATIA DIABÉTICA

3.1. Anatomia e fisiologia da coróide

A palavra coróide vem do grego: *korio-aydez*, em que *korio* significa membrana à volta do feto e *aydez* similar a ¹⁶⁰. Cerca de 95% do fluxo sanguíneo do olho provem da úvea, em que a coróide é responsável por mais do que 70% deste fluxo ¹⁶¹. A coróide é o tecido do corpo humano com maior fluxo sanguíneo por unidade de peso, sendo este cerca de 20 a 30 vezes superior ao da retina ¹⁶².

As principais funções da coróide são a nutrição com oxigénio e metabolitos, das camadas externas da retina, principalmente do EPR, da camada dos fotorreceptores e possivelmente da porção pré-laminar do nervo ótico ¹⁶³, a termorregulação, absorção da luz e um possível papel na acomodação ¹⁶⁴. A coróide é principalmente composta por vasos sanguíneos embora também contenha tecido conjuntivo, melanócitos, neurónios intrínsecos e células com elementos não vasculares músculo liso *like* ^{165,166}. Estas últimas predominam a nível da fóvea, crendo-se que possam ter um papel na sua estabilização contra os movimentos causados pela contração do músculo ciliar durante a acomodação ¹⁶⁷. Apesar desta constituição variada a coróide é tradicionalmente descrita como um conjunto de vasos dispostos em diferentes camadas (da porção mais interna para a externa): membrana de Bruch, coriocalilar, camada de Sattler e camada de Haller. A coróide é aderida à esclera por bandas de tecido conjuntivo que são facilmente separadas anteriormente criando um espaço – espaço supracoroideu. A membrana de Bruch é composta por tecido conjuntivo rico em colagénio e elastina separando a coriocalilar do EPR. Assim, permite a adesão e migração do EPR constituindo uma barreira à migração celular entre a coróide e a retina ^{168,169}. A coriocalilar e a membrana de Bruch assim como o EPR e camada de fotorreceptores formam um complexo metabólico e estrutural importante, cuja interdependência é fundamental na integridade de cada um destes componentes ¹⁷⁰. A coriocalilar é uma camada plana de pequenos vasos com lúmen ligeiramente maior que os capilares típicos. Isoformas solúveis de VEGF mantêm a vitalidade da coriocalilar e das suas fenestrações, assim como moléculas-1 de adesão intracelular promovem a adesão de macrófagos e neutrófilos às células endoteliais. A camada de Staller contém vasos sanguíneos de médio calibre enquanto na camada de Haller predominam largos vasos coroideus. A circulação retiniana e coroideia diferem substancialmente, tanto anatomicamente como funcionalmente. A circulação da retina é caracterizada por um baixo nível de fluxo sanguíneo ¹⁷¹ com elevado nível de extração de oxigénio (diferença arteriovenosa na pressão de oxigénio é de cerca de 40%) ^{172,173}. Contrariamente, o fluxo na circulação coroideia é muito elevado ¹⁷¹ e a extração de oxigénio é muito baixa (somente 3-4%) ¹⁷³⁻¹⁷⁵. Este elevado fluxo sanguíneo na

coróide é facilitado pela baixa resistência ao nível dos seus capilares, quando comparada com os capilares retinianos. Outra diferença ainda entre estes capilares é o fato de os capilares coróides serem providos de fenestrações permitindo a passagem da proteína de ligação ao retinol para a retina ¹⁷⁶.

Quase todos os tecidos do corpo humano têm alguma forma de autorregulação, que é definida como a capacidade do leito vascular manter o fluxo sanguíneo constante apesar de alterações na pressão de perfusão ou como a capacidade de um tecido adaptar o seu fluxo sanguíneo de acordo com as necessidades metabólicas ¹⁷⁷. Contudo, a autorregulação da coróide é um tema controverso. Alguns autores demonstraram que a coróide não tem capacidade de autorregulação quando o gradiente da pressão de perfusão é diminuído pelo aumento da pressão intraocular (PIO) ^{162,178}. Outros autores verificaram que o fluxo sanguíneo da coróide varia com a PIO, pressão de perfusão, produção de óxido nítrico e com a produção de substâncias vasoativas por parte de células ganglionares coróideas ¹⁷⁹. Assim, vários autores sugerem que a coróide tem alguma capacidade de autorregulação durante as mudanças na pressão de perfusão ¹⁸⁰⁻¹⁸². Os mecanismos tróficos indiretos potencialmente envolvidos na autorregulação da coróide ainda não foram totalmente elucidados ¹⁶⁰.

A coróide é um tecido rico em inervação autonómica, sendo innervada pelos nervos longo e curto ciliar posterior, que emitem ramos para a coróide quando passam através do espaço supracoróideu e perdem a sua bainha de mielina. Estes ramos formam um plexo a diferentes níveis da coróide, os axónios terminais estendem-se até ao nível subcapilar, mas não são identificados a nível coriocapilar ^{183,184}. As fibras nervosas são intercaladas com fibrócitos e melanócitos mas separadas destes últimos por uma membrana basal.

Uma vez que a coróide se localiza entre uma estrutura pigmentada o EPR, e outra fibrosa, rígida e opaca a esclera, é difícil ser visualizada através de exames complementares de diagnóstico. Até ao aparecimento de novas técnicas de OCT, só se conseguia estudar a coróide através da angiografia com verde de indocianina, ultrassonografia e fluxometria laser doppler. No entanto, a angiografia é uma técnica invasiva e a ultrassonografia não permite boa definição da coróide em condições não patológicas. Os avanços técnicos nos FD e SD-OCTs, com o modo EDI e SS-OCT, permitiram de forma não invasiva obter imagens da coróide, sendo possível medir a sua espessura e individualizar as diferentes camadas ¹⁶⁰. O SS-OCT oferece algumas vantagens sobre o SD-OCT/EDI pelo seu comprimento de onda mais longo, incluindo o aumento da profundidade através da imagem completa, diminuição do *washout* do limite, uma melhor resolução axial e eficiência de deteção mais elevada ¹⁸⁵. No entanto existem estudos que demonstram resultados similares entre os dois métodos tomográficos ^{186,187}.

3.2. Espessura da coróide e variações fisiológicas

A espessura total da coróide é definida como a distância entre o limite externo da camada hiperrefletiva, correspondente ao complexo membrana de Bruch/EPR, e a interface coróide-escleral.

O primeiro estudo sobre a espessura da coróide utilizando OCT-EDI foi realizado por Margolis e Spaide em 2009¹⁸⁸. Os autores identificaram em voluntários saudáveis uma espessura da coróide subfoveal média de 287 μm . A espessura da coróide subfoveal tem uma grande variação na população saudável, pelo que determinar valores normativos tem sido um grande desafio, assim como a comparação entre os estudos nem sempre é fácil pelas diferentes características clínicas e demográficas das amostras. Esta variabilidade está relacionada com a idade, género, comprimento axial e erro refrativo¹⁸⁸⁻¹⁹⁰. Assim, sabemos hoje, que a espessura da coróide diminui com a idade, segundo Margolis e Spaide cerca de 15.6 μm por cada década de vida¹⁸⁸. Estudos histológicos *post mortem* identificaram uma diminuição da espessura da coróide de 1.1 μm por ano, no entanto a ausência de pressão sanguínea justifica esta diminuição face aos olhos *in vivo*¹⁹¹⁻¹⁹³. Ruiz-Medrano *et al.* estudaram a espessura da coróide subfoveal de 276 olhos saudáveis através do SS-OCT e verificaram que a mesma diminui principalmente após os 40 anos de idade: 325.6 \pm 51.1 μm (0-10 anos), 316.7 \pm 90.1 μm (11-20 anos), 313.9 \pm 80.3 μm (21-40 anos), 264.6 \pm 79.3 μm (41-60 anos), 276.3 \pm 88.8 μm (> 60 anos)¹⁹⁴.

A espessura da coróide é ainda, negativamente correlacionada com o comprimento axial do olho¹⁹⁵⁻¹⁹⁸ e positivamente com o erro refrativo¹⁹⁹⁻²⁰¹ e com o género masculino em idades jovens¹⁹⁸. Esta última associação não foi confirmada noutros estudos^{188,197,199,200,202-204}. A espessura da coróide varia ainda com o *shift* refrativo, tendo uma maior espessura com a desfocagem miópica do que com a hipermetrópica²⁰⁵.

Margolis e Spaide demonstraram que a coróide macular tem uma assimetria natural, sendo mais espessa a nível subfoveal, diminuindo a espessura na direção nasal, atingindo os 145 μm a 3 mm nasais à fóvea¹⁸⁸. Esta diminuição nasal poderá contribuir para duas condições clínicas relacionadas: a atrofia peripapilar e a neuropatia glaucomatosa. Para além disso a coróide tem menor espessura no quadrante nasal do que no temporal, assim como no quadrante inferior relativamente ao superior^{197,201,203,206}. A nível peripapilar a coróide tem a menor espessura no quadrante inferior, característica esta, possivelmente relacionada com o encerramento embriológico da vesícula ótica^{207,208}.

Para além de todas estas variações a espessura da coróide tem também uma flutuação diurna, sendo maior às 9h e menor às 17h, podendo variar em média 33.7 μm ao longo do dia²⁰⁹.

3.3. Coróide e diabetes

Não será surpresa que a DM enquanto doença vascular afete a coróide, a estrutura ocular com maior fluxo sanguíneo. Vários estudos histológicos identificaram alterações vasculares na coróide de doentes diabéticos similares às observadas na RD: aumento da tortuosidade vascular, *outpouchings* vasculares, microaneurismas, áreas de não-perfusão, dilatações e estreitamentos do lúmen vascular e neovascularização coroideia ²¹⁰⁻²¹². Estas alterações patológicas afetam principalmente a coriocapilar e predominam na média-periferia, no entanto vasos maiores das outras camadas coroideias também podem ser afetados. Nagaoka *et al.* utilizaram a fluxometria doppler laser para estudar o fluxo sanguíneo coroideu de doentes diabéticos com e sem RD e detetaram uma redução do mesmo em todos os doentes, mas especialmente na RDNP e na presença de edema macular ²¹³. Os autores teorizaram que as alterações da coriocapilar podem preceder o desenvolvimento da RD e que a redução do fluxo sanguíneo coroideu pode originar hipoxia retiniana com consequente expressão de VEGF, o qual está implicado na patogénese da RD.

Recentemente, os novos métodos tomográficos óticos, EDI-OCT, SS-OCT e OCTA, permitiram avanços significativos no estudo da imagem da coróide e na coroidopatia diabética. No entanto a correlação entre a RD e a coroidopatia diabética permanece por esclarecer ²¹⁴.

Ferrara *et al.* usaram o *en-face* SS-OCT para estudar 76 olhos comparando as imagens de olhos diabéticos com olhos não diabéticos e mesmo nos doentes sem RD foram detetadas alterações a nível da coróide, correspondendo a remodelação vascular com vasos coroideus irregulares e tortuosos com dilatações e estreitamentos focais ²¹⁵.

Na análise de todos os trabalhos, devemos ter em conta que as alterações vasculares diabéticas, tanto na coróide como na retina, podem ser moduladas pela presença de outros fatores de risco cardiovasculares como a HTA e a dislipidemia.

Em resumo, dadas as divergências encontradas nos diferentes estudos e ao mesmo tempo as semelhanças entre a fisiopatologia da retinopatia e da coroidopatia diabéticas, ainda não se conhece o verdadeiro potencial de estudar a espessura da coróide. Pode existir vantagem na identificação precoce das suas alterações que potencialmente possam ajudar ou complementar as limitações diagnósticas e preditivas já identificadas com estratégias atuais.

CAPÍTULO II – OBJETIVOS

1. OBJETIVO GERAL

- Analisar se a RD é inicialmente caracterizada por alterações microvasculares fundoscopicamente visíveis ou por alterações estruturais retinianas correspondentes a um processo de neurodegeneração.

O objetivo geral teve duas fases:

1. Identificar alterações estruturais das diferentes camadas da retina e coróide de doentes diabéticos tipo 2 sem qualquer alteração fundoscópica (sem RD). Neste contexto, a criação de um grupo de controlo com indivíduos não diabéticos permitiu explorar a eventual presença de padrões estruturais associados a esta doença.
2. Identificar que alterações dos parâmetros estruturais retinianos ou coróideus ocorreram ao fim de um ano de seguimento dos doentes diabéticos e quais as diferenças entre os doentes diabéticos que desenvolveram RD e os que se mantiveram sem retinopatia.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar alterações significativas nas camadas da retina e coróide de doentes diabéticos tipo 2 sem RD clinicamente evidente face a indivíduos não diabéticos, através do SD-OCT.
- Identificar características demográficas (idade e género), fatores sistémicos (duração da doença, pressão arterial média (PAM), glicemia e HbA1c) e oculares (equivalente esférico, comprimento axial, PIO e amplitude de pulso ocular (APO)) que possam estar associados com as alterações da retina e coróide dos doentes diabéticos sem RD.
- Relacionar as variáveis em estudo (espessuras das diferentes camadas da retina e coróide) com a progressão da doença, identificando fatores sistémicos e oculares que possam estar associados às alterações da retina e coróide dos doentes diabéticos.

CAPÍTULO III – MÉTODOS

1. LOCAL DE EXECUÇÃO

Este projeto sobre a Retinopatia Diabética foi realizado no Serviço de Oftalmologia do Centro Hospitalar de Lisboa Central (CHLC), tendo decorrido entre outubro de 2013 e dezembro de 2015.

2. POPULAÇÃO

Foram incluídos dois grupos de estudo:

- doentes diabéticos tipo 2 sem RD,
- indivíduos não diabéticos.

Para a última visita do estudo longitudinal considerou-se um grupo de 100 doentes diabéticos sem RD (maior amostra da literatura, à data). Tendo em conta a prevalência de 16.3% da RD (descrita no estudo RETINODIAB que consistiu na avaliação do programa de rastreio da RD na Região de Saúde de Lisboa e Vale do Tejo ²⁹), assim como os critérios de inclusão e exclusão deste estudo, o grupo de doentes diabéticos foi selecionado da consulta de Diabetes Ocular realizada a 250 doentes diabéticos enviados dos Centros de Saúde para Centros Hospitalares (no âmbito do programa nacional de rastreio da RD referido). De acordo com a Direção Geral de Saúde o diagnóstico de diabetes foi feito com base nos seguintes parâmetros e valores ⁸:

- a) Glicemia de jejum ≥ 126 mg/dl (ou ≥ 7.0 mmol/l) ou
- b) Sintomas clássicos + glicemia ocasional ≥ 200 mg/dl (ou ≥ 11.1 mmol/l) ou
- c) Glicemia ≥ 200 mg/dl (ou ≥ 11.1 mmol/l) às 2 horas, na PTGO com 75 g de glicose ou
- d) HbA1c $\geq 6.5\%$.

O diagnóstico de DM tipo 2 foi validado após consulta do processo clínico da Unidade de Saúde Familiar de cada doente, através da Plataforma de Dados de Saúde disponível no sistema informático *SClínico* utilizado na consulta de Oftalmologia do CHLC.

O grupo de indivíduos não diabéticos foi recrutado da consulta de Oftalmologia Geral do CHLC realizada para correção de erros refrativos. Neste grupo foi também confirmada a ausência de DM ou de pré-diabetes após consulta dos valores analíticos de cada doente, disponíveis no processo clínico da Unidade de Saúde Familiar obtido através da Plataforma de Dados de Saúde.

Um olho de cada doente foi aleatoriamente incluído no estudo, de forma a reduzir os potenciais viés das condições sistémicas que podem afetar simultaneamente ambos os olhos. Esta escolha aleatória foi realizada por outro oftalmologista não incluído no rastreio dos doentes ou na realização de qualquer exame aos mesmos.

3. CONSENTIMENTO INFORMADO

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do CHLC (Processo nº 139-2013) e da Faculdade de Ciências Médicas de Lisboa (Processo nº48/2014/CEFCM) e foi conduzido de acordo com as boas práticas clínicas e princípios da Declaração de Helsínquia.

Cada doente assinou o Consentimento Informado antes da sua participação no estudo.

4. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Os critérios de inclusão foram:

1. Grupo de diabéticos:

- diagnóstico de DM tipo 2;
- sem RD;
- capacidade mental para entender o estudo em causa.

2. Grupo de indivíduos não diabéticos:

- indivíduos não diabéticos;
- capacidade mental para entender o estudo em causa.

Os critérios de exclusão para ambos os grupos foram:

1. Condições oftalmológicas:

- erros refrativos maiores que 5 dioptrias (D) e/ou comprimento axial maior que 25 mm no olho estudado;
- diagnóstico de RD ou outras patologias vasculares retinianas uni ou bilateralmente;
- diagnóstico de glaucoma ou hipertensão ocular;
- diagnóstico de outras patologias oftalmológicas como uveítes e/ou neuropatias;
- opacidades dos meios que prejudicassem a obtenção de imagens do fundo do olho.

2. Condições sistêmicas:

- diagnóstico conhecido de doenças neurodegenerativas;
- condições intracranianas ou orbitárias conhecidas.

5. DESENHO EPIDEMIOLÓGICO E PLANEAMENTO

Estudo longitudinal da análise da espessura das diferentes camadas da retina e coróide de doentes diabéticos tipo 2 sem RD. Uma visita de rastreio (V0) foi realizada de forma a recrutar doentes diabéticos e indivíduos não diabéticos que cumprissem os critérios de inclusão de forma a constituir ambos os grupos. Na visita de inclusão (V1), as espessuras retinianas e coroideias foram comparadas entre doentes diabéticos tipo 2 sem RD e indivíduos não diabéticos. Após um ano, realizou-se a visita dos 12 meses de *follow-up* (V2), em que a *coorte* de doentes diabéticos foi novamente estudada de forma a identificar os doentes que desenvolveram RD e a avaliar como se comportaram as diferentes camadas da retina e coróide após este intervalo de tempo.

Foram estudadas as associações entre as espessuras destas camadas e as características demográficas (idade e género), fatores sistémicos (PAM, glicemia e HbA1c) e oculares (equivalente esférico, comprimento axial, PIO e APO).

A tabela 6 descreve o esquema das diferentes visitas e exames realizados em cada momento.

Tabela 6 - Procedimentos realizados em cada visita

Consultas/ Procedimentos	História clínica	MAVC	Biomicroscopia	PIO	FO	Retino	Bio	SD- OCT	PA	Glicemia	HbA1c
Visita de rastreio, (V0)	X	X	X	X	X		X				
Visita de inclusão, (V1)		X	X	X	X	X		X	X	X	X
Visita aos 12 meses de <i>follow-up</i> (V2)	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X

MAVC - Melhor Acuidade Visual Corrigida, PIO - Pressão Intraocular, FO - Fundoscopia, Retino - Retinografia, Bio - Biometria, SD-OCT - *Spectral Domain-Optical Coherence Tomography*, PA - Pressão Arterial, HbA1c - Hemoglobina Glicada.

6. PROCEDIMENTOS

Na visita de rastreio (V0) (entre outubro de 2013 e outubro de 2014) foi proposto a todos os doentes consecutivos das consultas de Diabetes Ocular e Consulta Geral que poderiam preencher os critérios de inclusão para participar no estudo. Desta forma, nesta visita foram colhidos e registados os dados demográficos e os antecedentes pessoais sistémicos (incluindo os hábitos farmacológicos detalhados) e oftalmológicos, assim como foi realizada uma observação oftalmológica que incluiu a melhor acuidade visual corrigida (MAVC), a biomicroscopia, tonometria, fundoscopia e biometria ultrassónica. Após esta visita, os doentes que preencheram os critérios de elegibilidade assinaram o consentimento informado para participação no estudo. Numa posterior visita de inclusão (V1), realizaram nova avaliação oftalmológica que incluiu a MAVC, biomicroscopia, tonometria com tonómetro de Goldmann e tonómetro de contorno dinâmico, fundoscopia, retinografia e SD-OCT. As pressões arteriais, sistólica (PAS) e diastólica (PAD), foram também registadas aquando esta observação oftalmológica. Nos doentes diabéticos foram ainda colhidas amostras de sangue em jejum para determinação da glicemia e HbA1c no mesmo dia da visita V1.

Após 12 meses de *follow-up* (V2) todos os doentes diabéticos foram novamente avaliados, à mesma hora que na visita V1, tendo sido repetida a história clínica de forma a identificar intercorrências ocorridas neste intervalo de tempo, e os exames da avaliação oftalmológica da visita V1: MAVC, biomicroscopia, tonometria Goldmann e com tonómetro de contorno dinâmico, fundoscopia, retinografia e SD-OCT. A PAS e PAD destes doentes também foram registadas, assim como as glicemias e HbA1c em jejum (Tabela 6).

6.1. Acuidade visual

A MAVC para longe, para cada olho, foi medida usando a escala de Snellen e convertida para o logaritmo do ângulo mínimo de resolução (logMAR).

6.2. Pressão intraocular

A PIO foi medida antes da midríase pupilar com tonómetro de aplanção de Goldmann e com o tonómetro de contorno dinâmico Pascal (Pascal®, *Ziemer Ophthalmic System*, Suíça). Em relação a esta última medição, só os valores de PIO com *score* de qualidade menor ou igual que 2 foram aceites.

6.3. Retinografia

Após midríase pupilar com tropicamida a 1% e fenilefrina a 10%, foi realizada fundoscopia com lente de Volk® de 90 D e 2 fotografias do fundo ocular foram obtidas, uma centrada na fóvea e outra no disco ótico, utilizando a câmara Topcon TRC 50dx – type 1A®.

6.4. Tomografia de coerência ótica - *Spectral Domain*

Os exames tomográficos foram obtidos utilizando o Spectralis SD-OCT (Heidelberg Engineering, Heidelberg, Germany®), *software* versão 6.0, sob condições mesópicas e após midríase farmacológica, conforme descrito previamente ²¹⁶. Todos os exames tomográficos foram realizados à mesma hora do dia (das 14 às 16h). As imagens foram obtidas por um técnico experiente e avaliadas por um oftalmologista, ambos sem conhecimento do diagnóstico dos doentes. Somente *scans* com imagens bem focadas, sem desalinhamentos, com um padrão contínuo sem falhas ou artefactos e com índice de qualidade (Q) maior que 20 db foram incluídos na análise.

A análise retiniana foi realizada com o protocolo *fast macular thickness*, 25 *scans* de alta resolução (20 x 20º, 6 x 6 mm) centrados na fóvea. Todos os *scans* foram revistos por um técnico durante a sua realização para assegurar que estavam centrados na fóvea e repetidos quando necessário.

O novo *software* de segmentação automática Spectralis foi utilizado para obtenção dos valores da espessura de cada camada retiniana, incluindo: espessura total da retina (RT), camada de fibras nervosas da retina (CFNR), camada de células ganglionares (CCG), camada plexiforme interna (CPI), camada nuclear interna (CNI), camada plexiforme externa (CPE), camada nuclear externa (CNE), EPR e camada de fotorreceptores (FR) (Figura 2). Quando necessário, esta segmentação automática foi verificada por dois oftalmologistas em ocultação para os dados clínicos, e corrigida a análise em regime de consenso.

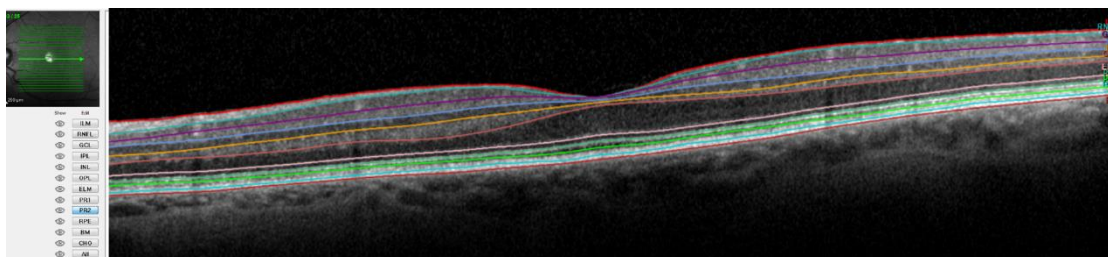


Figura 2 - Segmentação das camadas retinianas.

Para todas as camadas os valores de espessura foram calculados nas 9 áreas ETDRS. O gráfico ETDRS consiste em 3 anéis concêntricos de 1, 3 e 6 mm de diâmetro. Os dois anéis externos são divididos em quadrantes por duas linhas que se cruzam e cada setor será designado C (central), S3 (superior 3 mm), S6 (superior 6 mm), T3 (temporal 3 mm), T6 (temporal 6 mm), I3 (inferior 3 mm), I6 (inferior 6 mm), N3 (nasal 3 mm) e N6 (nasal 6 mm) (Figura 3).

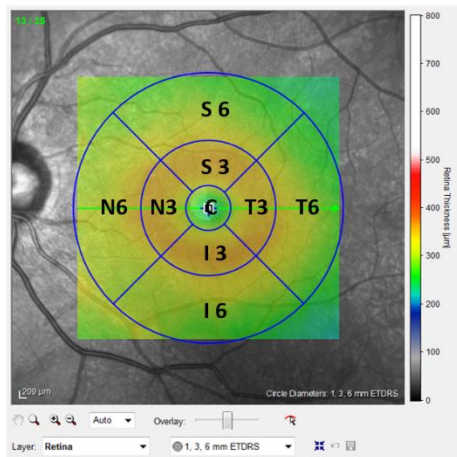


Figura 3 - Esquema representativo do mapa de espessura macular obtido a partir do *Spectral Domain Optical Coherence Tomography* (protocolo *Early Treatment Diabetic Retinopathy Study*).

Para a análise da coróide foram realizados *scans* com o modo EDI de acordo com o método previamente descrito²¹⁷. A espessura da coróide foi medida desde a porção externa da linha hiperrefletiva, correspondente ao EPR, até à linha hiporrefletiva correspondente à interface esclerocoroidal. Estas medições foram obtidas em 13 localizações: na zona subfoveal e em intervalos de 500 µm até 1500 µm nasal, temporal, superior e inferior à fóvea (Figura 4).

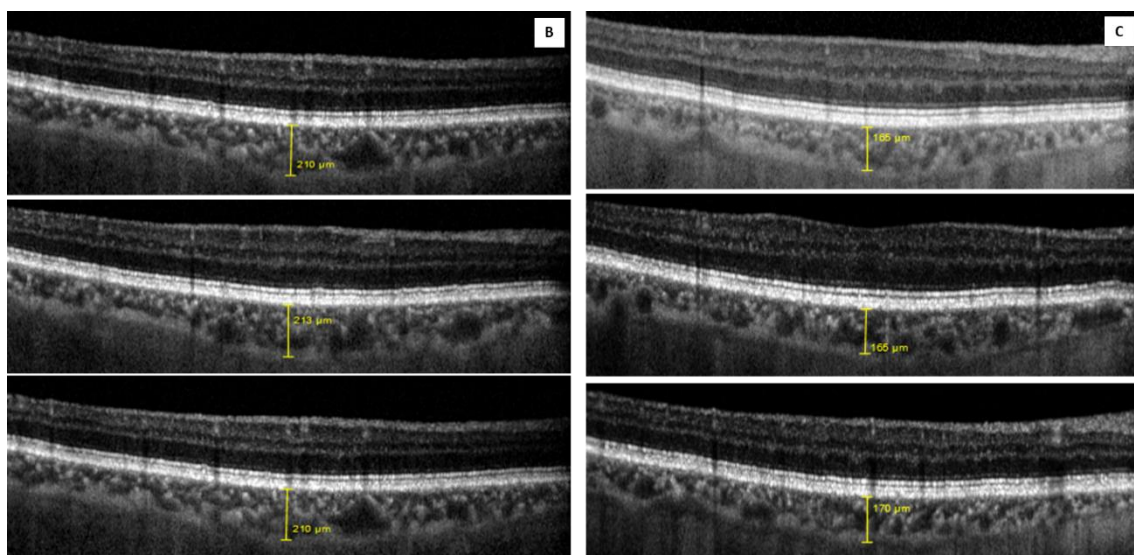
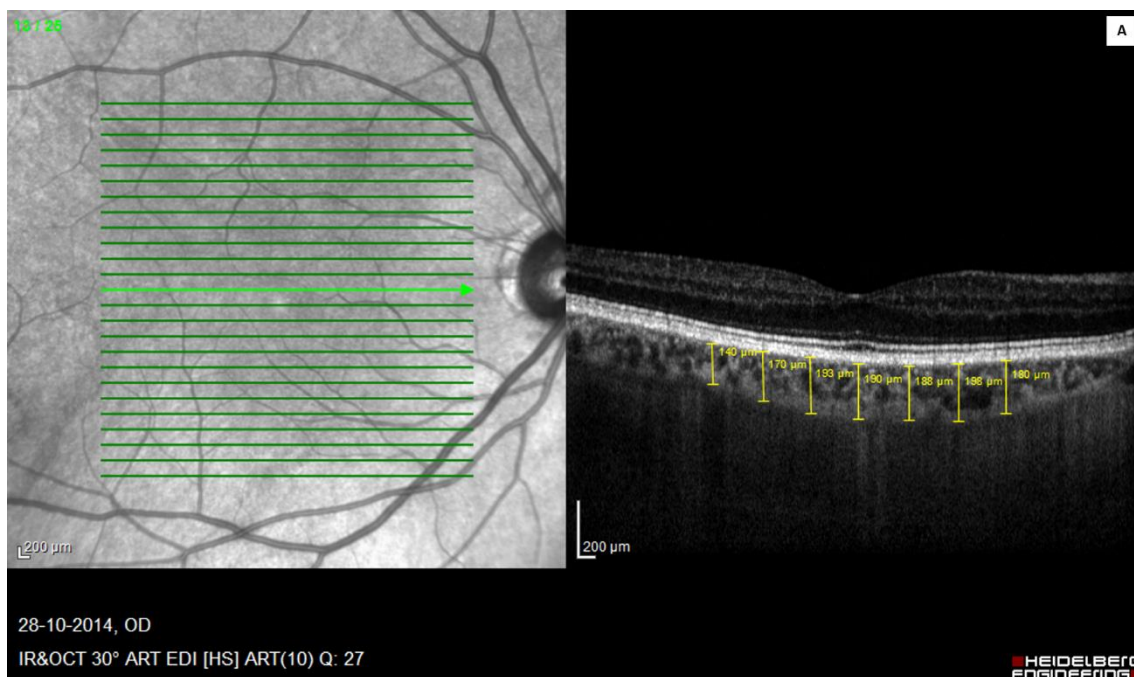


Figura 4 - Medições da espessura da coróide em 13 localizações: na zona subfoveal (A) e em intervalos de 500 μm até 1500 μm nasal (A), temporal (A), superior (B) e inferior (C) à fóvea.

6.5. Pressão arterial média

A pressão arterial foi medida na posição sentada com esfigmomanómetro automático e a pressão arterial sistólica e diastólica foram registadas. A PAM foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{PAM} = \text{PAD} + \frac{1}{3} (\text{PAS} - \text{PAD}).$$

7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada uma análise exploratória em que as variáveis categóricas foram apresentadas com frequências/percentagens, e as contínuas com média e desvio padrão (DP), ou mediana e amplitude interquartil (IQR: percentil 25 – percentil 75) e/ou amplitude (R: mínimo-máximo), conforme adequado. O teste *t-Student* e o teste não paramétrico de *Mann-Whitney* foram utilizados para comparar grupos. Para estudar associações entre variáveis foi utilizado o teste Qui-quadrado.

Para identificar as variáveis que explicam a variabilidade da espessura da coróide, considerando o grupo de diabéticos e o de não diabéticos, foram utilizados modelos de regressão linear. Uma análise estratificada por grupo também foi realizada e, para estudar a associação entre a espessura da coróide dos não diabéticos e a PAM, a PIO e a APO, foram utilizados gráficos de dispersão com suavizadores *Lowess (Locally Weighted Scatterplot Smoothers)* e modelos de regressão linear. Para os doentes diabéticos foram adicionadas a esta análise a duração da doença, a glicemia e a HbA1c.

Relativamente à análise da retina, modelos de regressão aditivos generalizados foram utilizados para identificar as variáveis que explicam a variabilidade da espessura das suas camadas. Para esta análise, os diabéticos foram classificados em três grupos de acordo com a duração da doença. Todos os modelos de regressão multivariável incluíram a idade, a PIO, o comprimento axial e o género para ajustar a associação entre os quatro grupos e a espessura das camadas retinianas. As covariáveis contínuas foram modeladas com *splines* devido à sua associação não-linear com a espessura de todas as camadas da retina. Em particular, os modelos de regressão multivariável das camadas do EPR e dos FR nos setores C, S3, I3, N3 e T3, também consideraram a variável espessura da coróide subfoveal, a 1000 µm superior, inferior, nasal e temporal à fóvea, respetivamente.

Os modelos lineares generalizados de efeitos mistos permitiram verificar a existência de diferenças entre os doentes diabéticos que desenvolveram RD e os que não desenvolveram, bem como identificar que alterações dos parâmetros estruturais retinianos ou coróideus ocorreram ao fim de um ano de seguimento.

A verificação da normalidade dos resíduos foi efetuada através do teste de *Kolmogorov-Smirnov* para ajustamento.

Foi considerado um nível de significância $\alpha = 0.05$. Correções de *Bonferroni* para testes múltiplos foram aplicadas. Os dados foram analisados utilizando o programa *Statistical Package for the Social Science para Windows* (IBM Corp. Lançado 2013. IBM SPSS Statistics para Windows,

versão 22.0 Armonk, NY:. IBM Corp.) e R (R: *A Language and Environment for Statistical Computing*, R Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, year = 2014, <http://www.R-project.org>).

CAPÍTULO IV – RESULTADOS

1. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS DA POPULAÇÃO

Dos 250 doentes diabéticos avaliados na visita de rastreio, no contexto do programa de rastreio nacional da RD, 125 cumpriam os critérios de elegibilidade e aceitaram participar no estudo. Da mesma forma, de 100 indivíduos não diabéticos avaliados na consulta de Oftalmologia Geral para correção de erros refrativos, 50 cumpriam os critérios de elegibilidade e aceitaram participar no estudo. Assim, o presente estudo incluiu dois grupos: um com 125 doentes diabéticos sem RD (63 doentes do género masculino), e outro com 50 indivíduos não diabéticos (20 doentes do género masculino).

À data da visita de inclusão (V1), a mediana da duração da diabetes foi de 60 meses (IQR: 30.0-126.0; R: 1.00-360.0) e a mediana da glicemia e da HbA1c foi de 137.0 mg/dl (IQR: 118.0-156.0 mg/dl) e 6.40 % (IQR: 6.00-7.00 %), respetivamente. As restantes características demográficas, clínicas e oftalmológicas dos grupos, exceto as espessuras das camadas da retina e coróide, estão representadas na Tabela 7.

Tabela 7 - Características demográficas e clínicas por grupo

	Doentes diabéticos (n=125)	Indivíduos não diabéticos (n=50)	Valor p
Género masculino n (%)	63.00 (50.40)	20.00 (40.00)	0.213*
Idade (anos)	66.90 (9.33)	69.18 (8.55)	0.136
MAVC (logMAR)	0.05 (0.10)	0.02 (0.05)	0.015
PIO – Goldmann (mmHg)	16.28 (3.08)	14.79 (2.76)	0.003
PIO - Pascal (mmHg)	19.06 (3.56)	18.25 (3.10)	0.163
APO	2.80 (2.30-4.20)	3.10 (2.40-3.95)	0.488 [§]
Equivalente esférico	0.63 (1.53)	0.19 (1.93)	0.114
Comprimento axial (mm)	23.11 (0.81)	22.51 (1.12)	0.072
Biomicroscopia - fáquico n (%)	119.00 (95.20)	41.00 (82.00)	0.013**
Duração da diabetes (meses)	60.00 (30.00-126.00)	-	
Pressão arterial média (mmHg)	97.00 (91.50-108.00)	97.50 (92.75-105.00)	0.930 [§]
HbA1c (%)	6.40 (6.00-7.00)	-	
Glicemia (mg/dl)	137.00 (118.00-156.00)	-	

Resultados expressos em média (DP) ou mediana (IQR: P₂₅ – P₇₅). * Teste Qui-quadrado; ** Teste exato de Fisher; [§] Teste de Mann-Whitney; restantes valores p obtidos pelo teste *t-Student*. MAVC - Melhor Acuidade Visual Corrigida, PIO - Pressão Intraocular, APO - Amplitude de Pulso Ocular, HbA1c - Hemoglobina Glicada.

As principais classes de fármacos de ambos os grupos estão representadas na Tabela 8.

Tabela 8 - Fármacos de cada grupo de doentes

Classe farmacológica n (%)	Doentes diabéticos (n=125)	Indivíduos não diabéticos (n=50)
IECA	48 (38.4)	8 (16.0)
ARA	43 (34.4)	10 (20.0)
B-bloqueantes	24 (19.2)	6 (12.0)
Diuréticos	64 (51.2)	10 (20.0)
Bloqueadores dos canais de cálcio	32 (25.6)	3 (6.0)
Agonistas alfa adrenérgicos	1 (0.8)	0
ADO	123 (98.4)	-
Insulina	6 (4.8)	-
Estatinas	90 (72.0)	24 (48.0)
Nitratos	1 (0.8)	0
Tiazidas	2 (1.6)	0

IECA - Inibidores da Enzima de Conversão da Angiotensina, ARA - Antagonista dos Recetores da Angiotensina, ADO - Antidiabéticos Orais.

Ao fim de 12 meses, na visita V2, foram convocados todos os 125 doentes diabéticos, conforme protocolo inicial. Destes 125 doentes faltaram 19 (quando contactados, 18 não justificaram a sua ausência e um tinha falecido) e dos restantes 106, 3 apresentaram nas imagens de OCT membranas epiretinianas subclínicas (*attrition rate* de 17.6%). Dos 103 doentes diabéticos que completaram o estudo, 9 desenvolveram RD (8.7%) (Figura 5). As características demográficas, clínicas e oftalmológicas, exceto as espessuras das camadas da retina e coróide, referentes a esta visita V2 estão representadas na Tabela 9.

Tabela 9 - Características demográficas e clínicas dos doentes diabéticos (Visita 2)

	Doentes diabéticos sem RD (n=94)	Doentes diabéticos com RD (n=9)
Género masculino n (%)	49.00 (52.10)	4.00 (44.40)
Idade (anos)	66.54 (8.76)	75.33 (8.46)
MAVC (logMAR)	0.05 (0.08)	0.02 (0.03)
PIO – Goldmann (mmHg)	16.43 (2.86)	17.22 (2.33)
PIO - Pascal (mmHg)	18.83 (3.00)	18.27 (2.45)
APO	2.95 (2.38-4.13)	2.70 (2.15-4.15)
Equivalente esférico	0.60 (1.45)	0.13 (1.38)
Comprimento axial (mm)	23.14 (0.79)	23.17 (1.21)
Biomicroscopia - fáquico n (%)	91.00 (96.8)	7.00 (77.8)
Duração da diabetes (meses)	60.00 (24.00-120.00)	168.00 (78.00-264.00)
Pressão arterial média (mmHg)	98.00 (92.75-103.00)	101.00 (96.50-105.50)
HbA1c (%)	6.50 (6.00-7.11)	7.40 (6.55-8.05)
Glicemia (mg/dl)	130.00 (112.00-145.00)	136.00 (112.50-175.00)

Resultados expressos em média (DP) ou mediana (IQR: P₂₅ - P₇₅). MAVC - Melhor Acuidade Visual Corrigida, PIO - Pressão Intraocular, APO - Amplitude de Pulso Ocular, HbA1c - Hemoglobina Glicada.

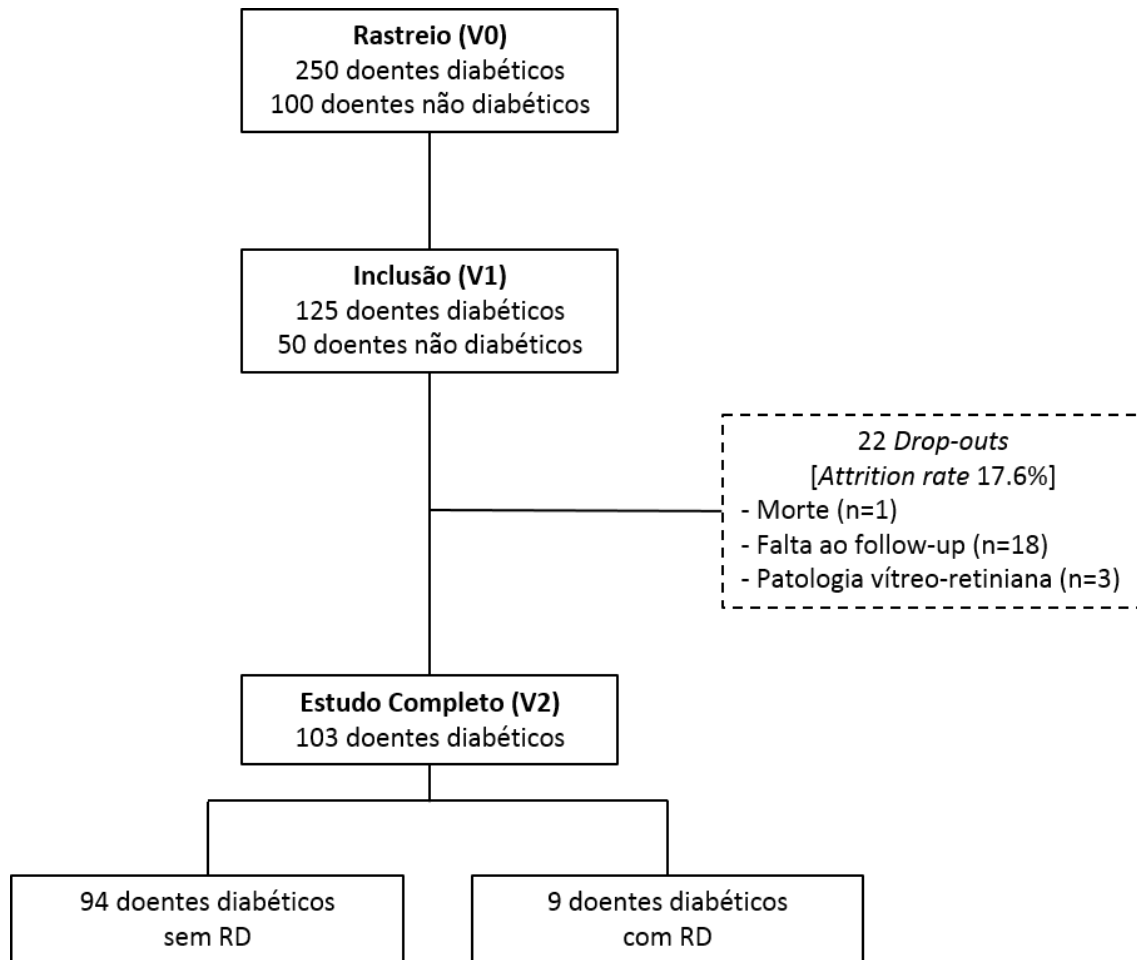


Figura 5 - Fluxograma do estudo longitudinal.

2. CORÓIDE – EDI-OCT

2.1. Visita V1

2.1.1. Associações entre a espessura da coróide e fatores sistémicos e oculares

A distribuição global da espessura da coróide ao longo dos quatro quadrantes foi semelhante entre os grupos diabético e não diabético, respeitando o mesmo padrão (valores maiores nos quadrantes superiores do que nos inferiores, assim como nos quadrantes temporais relativamente aos nasais). Na análise univariável, verificou-se uma maior espessura da coróide nas 13 localizações em estudo, dos doentes diabéticos face aos não diabéticos. No entanto, esta diferença só atingiu significância estatística num local (a 1500 μm superior da fóvea), 267.89 (67.49) *versus* 239.88 (55.98) μm ($p = 0.010$). A descrição detalhada da espessura da coróide de ambos os grupos está representada na Tabela 10.

Tabela 10 - Espessura da coróide (μm) nas 13 localizações, por grupo

	Doentes diabéticos (n=125)	Indivíduos não diabéticos (n=50)	Valor p
Subfoveal central	260.68 (65.89)	242.80 (55.78)	0.093
Temporal 500 μm	253.25 (63.88)	240.04 (56.84)	0.204
Temporal 1000 μm	245.60 (59.37)	229.12 (53.95)	0.091
Temporal 1500 μm	236.17 (57.85)	221.62 (55.13)	0.130
Nasal 500 μm	248.78 (66.20)	230.64 (63.59)	0.100
Nasal 1000 μm	237.02 (67.99)	219.10 (65.35)	0.113
Nasal 1500 μm	220.81 (70.22)	201.08 (69.28)	0.094
Superior 500 μm	261.94 (66.41)	246.16 (61.52)	0.149
Superior 1000 μm	262.21 (65.59)	248.00 (38.52)	0.184
Superior 1500 μm	267.89 (67.49)	239.88 (55.98)	0.010*
Inferior 500 μm	249.62 (62.44)	238.18 (68.08)	0.288
Inferior 1000 μm	248.36 (68.09)	236.44 (66.32)	0.293
Inferior 1500 μm	249.81 (69.57)	228.98 (74.90)	0.082

Resultados expressos com média (DP). Valores p obtidos pelo teste de *Mann-Whitney*.

A diferença da espessura da coróide entre o grupo de diabéticos e o de não diabéticos foi significativa em dois locais, 1500 μm nasal (estimativa do coeficiente de regressão: 24.27; Intervalo de Confiança de 95%: 1.57 - 46.98; $p = 0.036$) e 1500 μm superior à fóvea (estimativa do coeficiente de regressão: 23.41; Intervalo de Confiança de 95%: 3.58 - 43.24; $p = 0.021$) (Tabela 11). Esta diferença foi obtida por um modelo múltiplo e ajustada pelas seguintes variáveis: idade, género, acuidade visual, PIO, APO, equivalente esférico, comprimento axial, PAM e fármacos utilizados. No entanto, após aplicar as correções de *Bonferroni*, o diferencial de espessura da coróide dos doentes diabéticos em relação aos controlos, tornou-se não significativo (verificado nas 13 localizações, de 6.16 a 24.27 μm).

Tabela 11 - Resultados dos modelos de regressão linear multivariáveis - Coróide

Modelo*	Coefficiente estimado	Valor p	Intervalo de Confiança de 95%	
Variável dependente: espessura da coróide subfoveal central				
Grupo diabético	13.728	0.170	-5.930	33.385
Idade	-2.169	< 0.001	-3.142	-1.196
APO	9.411	0.006	2.762	16.060
Variável dependente: espessura da coróide 500 µm temporal à fóvea				
Grupo diabético	8.715	0.375	-10.611	28.041
Idade	-2.237	< 0.001	-3.194	-1.281
APO	7.241	0.030	.704	13.777
Variável dependente: espessura da coróide 1000 µm temporal à fóvea				
Grupo diabético	12.466	0.172	-5.486	30.417
Idade	-2.068	< 0.001	-2.957	-1.180
APO	8.327	0.007	2.255	14.399
Variável dependente: espessura da coróide 1500 µm temporal à fóvea				
Grupo diabético	10.450	0.247	-7.290	28.190
Idade	-2.071	< 0.001	-2.949	-1.192
APO	7.405	0.016	1.405	13.405
Variável dependente: espessura da coróide 500 µm nasal à fóvea				
Grupo diabético	13.662	0.190	-6.844	34.168
Idade	-2.259	< 0.001	-3.274	-1.244
APO	7.962	0.025	1.026	14.898
Variável dependente: espessura da coróide 1000 µm nasal à fóvea				
Grupo diabético	20.685	0.065	-1.340	42.711
Idade	-2.149	< 0.001	-3.197	-1.101
Comprimento axial	-12.825	0.018	-23.378	-2.273
Variável dependente: espessura da coróide 1500 µm nasal à fóvea				
Grupo diabético	24.271	0.036	1.566	46.976
Idade	-2.228	<0.001	-3.308	-1.147
Comprimento axial	-16.105	0.004	-26.983	-5.226
Variável dependente: espessura da coróide 500 µm superior à fóvea				
Grupo diabético	11.134	0.278	-9.065	31.333
Idade	-2.357	< 0.001	-3.357	-1.357
APO	8.698	0.013	1.866	15.530
Variável dependente: espessura da coróide 1000 µm superior à fóvea				
Grupo diabético	9.538	0.337	-10.007	29.082
Idade	-2.408	< 0.001	-3.375	-1.440
APO	9.731	0.004	3.121	16.342
Variável dependente: espessura da coróide 1500 µm superior à fóvea				
Grupo diabético	23.409	0.021	3.580	43.239
Idade	-2.385	<0.001	-3.366	-1.403
APO	9.958	0.004	3.251	16.665
Variável dependente: espessura da coróide 500 µm inferior à fóvea				
Grupo diabético	6.158	0.534	-13.356	25.672
Idade	-2.638	< 0.001	-3.604	-1.672
APO	8.767	0.010	2.167	15.368
Variável dependente: espessura da coróide 1000 µm inferior à fóvea				
Grupo diabético	6.545	0.532	-14.085	27.176
Idade	-2.713	< 0.001	-3.734	-1.691
APO	9.639	0.007	2.661	16.617
Variável dependente: espessura da coróide 1500 µm inferior à fóvea				
Grupo diabético	14.608	0.172	-6.417	35.633
Idade	-3.191	< 0.001	-4.232	-2.150
APO	12.533	0.001	5.421	19.644

*Categoria de referência: grupo não diabético; APO – amplitude de pulso ocular.

Em todas as localizações, independentemente do grupo, a espessura da coróide associou-se negativamente com a idade, com uma diminuição em média entre 2.1 e 3.2 μm por cada ano adicional. No que diz respeito à APO, esta também se associou com a espessura da coróide em quase todas as localizações, exceto nos 1000 e 1500 μm nasais à fóvea. Assim, por cada aumento de 1 mmHg no valor da APO, a espessura da coróide aumentou em média entre 7.2 e 12.5 μm .

2.1.2. Associações entre a espessura da coróide e fatores sistêmicos e oculares: diabéticos versus não diabéticos

Após uma análise específica para cada grupo, verificou-se que em ambos os grupos e em todas as localizações, a idade se mantém associada de forma negativa com a espessura da coróide ($p < 0.001$, $r = -0.319$ a -0.413). Estes resultados foram corroborados por análises de regressão linear múltiplas em que as estimativas da variável idade surgem todas negativas, mantendo significado estatístico após a correção de *Bonferroni* ($p < 0.001$ a $p = 0.003$) (para o grupo dos diabéticos consultar Tabela 12). Ao analisar a APO, esta só esteve associada com a espessura da coróide no grupo diabético e em 7 localizações (subfoveal central, 1000 μm temporais, 1000 e 1500 μm superiores e 500, 1000, e 1500 μm inferiores à fóvea) ($p = 0.006$ a $p = 0.024$). Neste grupo, por cada aumento de 1 mmHg no valor da APO, a espessura da coróide aumentou em média entre 8.5 e 11.6 μm (Tabela 12).

Tabela 12 - Resultados dos modelos de regressão linear multivariáveis para o grupo diabético

Modelo	Coefficiente estimado	Valor p	Intervalo de Confiança de 95%	
Variável dependente: espessura da coróide subfoveal central				
Idade	-1.977	0.001	-3.163	-0.791
APO	11.032	0.008	2.999	19.065
Variável dependente: espessura da coróide 1000 µm temporal à fóvea				
Idade	-1.814	0.001	-2.889	-0.739
APO	8.478	0.023	1.195	15.760
Variável dependente: espessura da coróide 1000 µm superior à fóvea				
Idade	-1.991	0.001	-3.174	-0.808
APO	10.259	0.013	2.242	18.276
Variável dependente: espessura da coróide 1500 µm superior à fóvea				
Idade	-1.876	0.003	-3.104	-0.649
APO	10.339	0.015	2.024	18.655
Variável dependente: espessura da coróide 500 µm inferior à fóvea				
Idade	-2.163	< 0.001	-3.279	-1.047
APO	8.999	0.020	1.439	16.558
Variável dependente: espessura da coróide 1000 µm inferior à fóvea				
Idade	-2.490	< 0.001	-3.701	-1.280
APO	9.441	0.024	1.242	17.641
Variável dependente: espessura da coróide 1500 µm inferior à fóvea				
Idade	-2.809	< 0.001	-4.016	-1.601
APO	11.622	0.006	3.441	19.803

APO – amplitude de pulso ocular.

A espessura da coróide não teve uma relação linear com a duração da doença, glicemia, HbA1c e PAM. No entanto, ao analisar os gráficos de dispersão destas variáveis, nos doentes diabéticos houve um padrão constante de distribuição da espessura da coróide de acordo com a duração da doença, glicemia e PAM. Assim, em todas as localizações, verificou-se que a espessura da coróide aumentou moderadamente durante os primeiros 77 meses de duração da DM, começando posteriormente a diminuir ligeiramente até aos 150 meses, seguindo-se uma estabilização do seu valor (Figura 6).

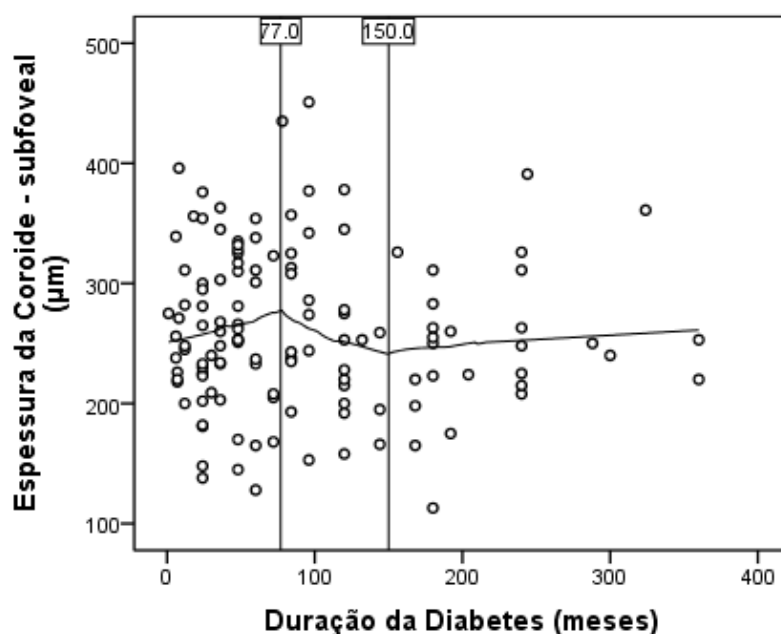


Figura 6 - Associação entre a espessura da coróide e a duração da diabetes.

Em relação à glicemia, verificou-se que a espessura da coróide inicialmente se manteve estável, com uma ligeira diminuição após 135 mg/dl e um aumento após os 160 mg/dl (Figura 7A). No entanto, para os diferentes valores de HbA1c, não houve flutuação na espessura da coróide (Figura 7B).

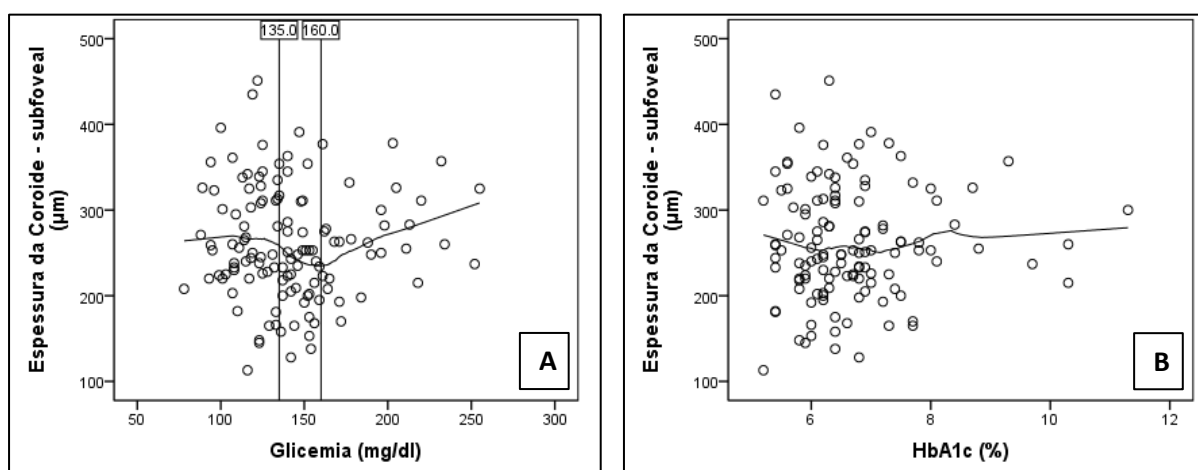


Figura 7 - Associação entre a espessura da coróide e a glicemia (A) e a hemoglobina glicada (HbA1c) (B).

Quanto à PAM, a espessura da coróide demonstrou uma flutuação ao longo de diferentes valores de PAM no grupo de indivíduos não diabéticos, mas no grupo diabético verificou-se uma ausência de variação desta espessura (Figura 8).

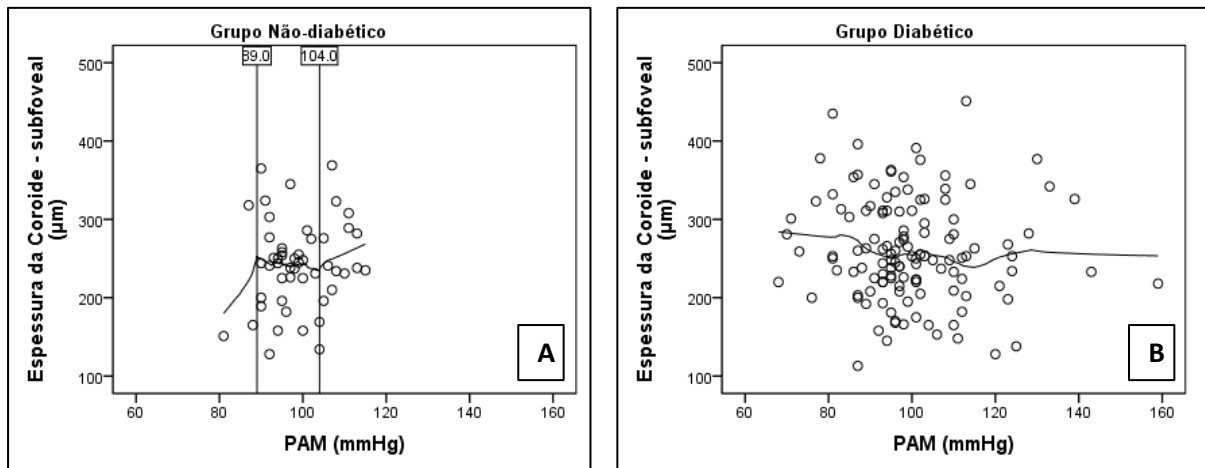


Figura 8 - Associação entre a espessura da coróide e a Pressão Arterial Média (PAM), em ambos os grupos: não diabéticos (A) e diabéticos (B).

2.2. Visita V2

2.2.1. Análise exploratória da espessura da coróide

Em ambos os grupos de doentes, diabéticos sem e com RD, a distribuição global da espessura da coróide ao longo dos quatro quadrantes mantém o mesmo padrão anteriormente descrito na visita V1 (valores maiores nos quadrantes superiores do que nos inferiores, assim como nos quadrantes temporais relativamente aos nasais).

Na visita V2, verificou-se que a espessura da coróide é maior no grupo de doentes diabéticos sem RD relativamente aos com RD em todas as localizações, no entanto, esta diferença não foi significativa (230.28 a 280.10 μm *versus* 217.00 a 269.56 μm). A descrição detalhada da espessura da coróide de ambos os grupos está representada na Tabela 13.

Tabela 13 - Espessura da coróide (μm) nas 13 localizações na visita V2 no grupo diabético

	Doentes diabéticos sem RD (n=94)	Doentes diabéticos com RD (n=9)	Valor p
Subfoveal central	271.71 (67.94)	262.44 (60.87)	0.607
Temporal 500 μm	271.88 (67.36)	251.78 (64.93)	0.300
Temporal 1000 μm	266.13 (65.62)	243.89 (57.81)	0.319
Temporal 1500 μm	254.09 (62.05)	233.56 (54.17)	0.355
Nasal 500 μm	263.38 (67.90)	262.78 (56.73)	0.911
Nasal 1000 μm	249.69 (69.06)	245.33 (55.04)	0.866
Nasal 1500 μm	230.28 (71.00)	217.00 (53.66)	0.579
Superior 500 μm	272.62 (62.90)	269.56 (63.37)	0.776
Superior 1000 μm	275.47 (64.46)	259.11 (61.62)	0.389
Superior 1500 μm	280.10 (64.00)	259.00 (60.49)	0.334
Inferior 500 μm	256.70 (62.97)	250.89 (54.30)	0.798
Inferior 1000 μm	256.90 (68.83)	248.56 (72.95)	0.754
Inferior 1500 μm	256.62 (72.69)	242.56 (81.81)	0.583

Resultados apresentados com média (DP). Valores p obtidos pelo teste de *Mann-Whitney*.

RD - Retinopatia Diabética.

Quanto às diferenças da espessura da coróide entre a visita V2 e a visita V1, nos subgrupos de doentes diabéticos com e sem RD, verificou-se que a diferença é menor no grupo com RD em 6 localizações (1000 μm nasais, 500 e 1000 μm superiores e 500, 1000 e 1500 μm inferiores à fóvea). Identificou-se, ainda, que a espessura da coróide continuou a aumentar em ambos os grupos na maioria das localizações, exceto a 500 μm superior e a 1000 μm inferior à fóvea no grupo diabético com RD (Tabela 14).

Tabela 14 - Diferenças entre as visitas V2 e V1 da espessura da coróide (μm), nas 13 localizações por grupo de diabéticos

	Doentes diabéticos sem RD (n=94)	Doentes diabéticos com RD (n=9)	Valor p
Subfoveal central	0.018 (0.178)	0.079 (0.068)	0.436
Temporal 500 μm	0.070 (0.189)	0.093 (0.078)	0.422
Temporal 1000 μm	0.074 (0.187)	0.174 (0.175)	0.109
Temporal 1500 μm	0.074 (0.185)	0.202 (0.266)	0.244
Nasal 500 μm	0.065 (0.165)	0.075 (0.062)	0.841
Nasal 1000 μm	0.052 (0.152)	0.048 (0.047)	0.839
Nasal 1500 μm	0.035 (0.133)	0.054 (0.097)	0.778
Superior 500 μm	0.050 (0.130)	-0.001 (0.102)	0.200
Superior 1000 μm	0.053 (0.149)	0.035 (0.081)	0.806
Superior 1500 μm	0.044 (0.137)	0.056 (0.083)	0.470
Inferior 500 μm	0.028 (0.165)	0.022 (0.072)	0.969
Inferior 1000 μm	0.037 (0.146)	-0.003 (0.133)	0.346
Inferior 1500 μm	0.019 (0.141)	0.016 (0.071)	0.960

Resultados apresentados com média (DP). Valores p obtidos pelo teste de *Mann-Whitney*.

RD - Retinopatia Diabética.

2.2.2. Associações entre a espessura da coróide e fatores sistémicos e oculares

Após a análise de regressão linear múltipla e a aplicação das correções de *Bonferroni*, verificou-se no conjunto dos doentes que a espessura da coróide foi superior em V2 relativamente a V1, em quase metade das localizações (500, 1000 e 1500 μm temporal; 500 e 1000 μm nasal; e 1000 μm superior à fóvea), variando entre 10.01 e 17.34 μm ($p < 0.001$ a 0.003) (Tabela 15).

Nestes modelos observou-se ainda que a espessura da coróide se associou de forma negativa com a idade, em 9 localizações, e com o comprimento axial em 4 localizações ($p < 0.004$). Por cada aumento de um ano de vida, a espessura da coróide nos doentes diabéticos diminui em média entre 1.63 a 2.54 μm . Assim como, por cada aumento de 1 mm no comprimento axial do globo ocular, a espessura da coróide diminui em média 20.19 a 24.91 μm .

Tabela 15 - Resultados dos modelos de regressão linear multivariáveis - Visita V2

Modelo*	Coefficiente estimado	Valor p	Intervalo de Confiança de 95%	
Variável dependente: espessura da coróide subfoveal central				
Δ EC V2-V1	7.903	0.076	-0.814	16.620
Idade	-1.961	0.002	-3.197	-0.726
Comprimento axial	-18.147	0.008	-31.636	-4.657
Variável dependente: espessura da coróide 500 μm temporal à fóvea				
Δ EC V2-V1	14.718	<0.001	6.511	22.926
Idade	-1.983	0.002	-3.212	-0.755
Comprimento axial	-15.649	0.022	-29.063	-2.235
Variável dependente: espessura da coróide 1000 μm temporal à fóvea				
Δ EC V2-V1	17.340	<0.001	8.807	25.873
Idade	-1.758	0.003	-2.906	-0.610
Comprimento axial	-16.126	0.012	-28.657	-3.595
Variável dependente: espessura da coróide 1500 μm temporal à fóvea				
Δ EC V2-V1	15.990	<0.001	7.612	24.368
Idade	-1.657	0.003	-2.753	-0.560
Comprimento axial	-16.457	0.007	-28.432	-4.482
Variável dependente: espessura da coróide 500 μm nasal à fóvea				
Δ EC V2-V1	13.291	0.001	5.612	20.971
Idade	-1.753	0.005	-2.990	-0.515
Comprimento axial	-21.029	0.002	-34.537	-7.521
Variável dependente: espessura da coróide 1000 μm nasal à fóvea				
Δ EC V2-V1	10.010	0.003	3.347	16.672
Idade	-1.635	0.012	-2.916	-0.353
Comprimento axial	-23.275	0.001	-37.270	-9.282
Variável dependente: espessura da coróide 1500 μm nasal à fóvea				
Δ EC V2-V1	6.563	0.022	0.950	12.176
Idade	-1.586	0.021	-2.932	-0.240
Comprimento axial	-24.913	0.001	-39.606	-10.219
Variável dependente: espessura da coróide 500 μm superior à fóvea				
Δ EC V2-V1	9.398	0.004	2.950	15.847
Idade	-1.630	0.009	-2.845	-0.414
Comprimento axial	-19.259	0.004	-32.541	-5.976
Variável dependente: espessura da coróide 1000 μm superior à fóvea				
Δ EC V2-V1	10.728	0.003	3.625	17.832
Idade	-1.877	0.003	-3.103	-0.652
Comprimento axial	-17.656	0.010	-31.039	-4.274
Variável dependente: espessura da coróide 1500 μm superior à fóvea				
Δ EC V2-V1	9.311	0.006	2.701	15.920
Idade	-1.744	0.006	-2.983	-0.505
Comprimento axial	-20.191	0.003	-33.717	-6.665
Variável dependente: espessura da coróide 500 μm inferior à fóvea				
Δ EC V2-V1	5.019	0.167	-2.100	12.139
Idade	-1.902	0.001	-3.049	-0.755
Comprimento axial	-15.741	0.014	-28.262	-3.220
Variável dependente: espessura da coróide 1000 μm inferior à fóvea				
Δ EC V2-V1	6.388	0.063	-0.351	13.128
Idade	-2.246	0.001	-3.537	-0.956
Comprimento axial	-18.810	0.009	-32.902	-4.718
Variável dependente: espessura da coróide 1500 μm inferior à fóvea				
Δ EC V2-V1	3.301	0.326	-3.291	9.893
Idade	-2.539	<0.001	-3.862	-1.215
Comprimento axial	-20.040	0.011	-35.424	-4.656

*Categoria de referência: medição da espessura em V1; Δ EC V2-V1: corresponde à diferença, em média, da espessura da coróide entre a visita V2 e V1; valores p obtidos através de modelos lineares generalizados de efeitos mistos.

3. CAMADAS DA RETINA

3.1. Visita V1

Na análise das diferentes camadas da retina os doentes diabéticos foram classificados em 3 grupos de acordo com a duração da doença: grupo I (< 5 anos, n = 55 doentes); grupo II (5 a 10 anos, n = 39 doentes); e grupo III (> 10 anos, n = 31 doentes). Características clínicas e demográficas destes grupos estão representadas na Tabela 16.

Tabela 16 - Características demográficas e clínicas dos doentes por grupo

	Doentes diabéticos (n=125)			Indivíduos não diabéticos (n=50)
	Grupo I (n = 55)	Grupo II (n = 39)	Grupo III (n = 31)	
Duração da diabetes	< 5 years	5 – 10 years	> 10 years	
Género masculino n (%)	26 (47)	23 (59)	14 (45)	20 (40)
Idade (anos)	65.82 (9.88)	66.95 (10.14)	68.74 (6.97)	69.18 (8.55)
MAVC (logMAR)	0.04 (0.07)	0.06 (0.13)	0.07 (0.10)	0.02 (0.05)
PIO – Goldmann (mmHg)	15.73 (3.08)	16.80 (2.98)	16.61 (3.14)	14.79 (2.76)
PIO - Pascal (mmHg)	19.03 (3.19)	19.02 (4.08)	19.07 (3.60)	18.25 (3.10)
APO	2.80 (2.20-4.50)	2.50 (2.30-3.20)	3.20 (2.30-4.50)	3.10 (2.40-3.95)
Equivalente esférico	0.50 (0.00-1.50)	0.38 (-0.13-1.50)	0.50 (-0.38-1.63)	0.31 (-1.00-1.56)
Comprimento axial (mm)	23.01 (0.82)	23.16 (0.81)	23.22 (0.78)	22.51 (1.12)
Biomicroscopia - fáquico n (%)	53 (96)	37 (95)	29 (94)	41 (82)
Pressão arterial média (mmHg)	97.00 (91.00-110.00)	97.00 (90.00-104.00)	99.00 (93.00-109.00)	97.50 (92.75-105.00)
HbA1c (%)	6.20 (5.80-6.80)	6.40 (6.00-7.20)	6.80 (6.30-7.50)	-
Glicemia	125.00 (114.00-145.00)	142.00 (122.00-161.00)	153.00 (133.00-168.00)	-

Resultados expressos em média (DP) ou mediana (IQR: P₂₅ - P₇₅). MAVC - Melhor Acuidade Visual Corrigida, PIO - Pressão Intraocular, APO - Amplitude de Pulso Ocular, HbA1c - Hemoglobina Glicada.

As espessuras das diferentes camadas da retina nas 9 localizações estão representadas na Figura 9.

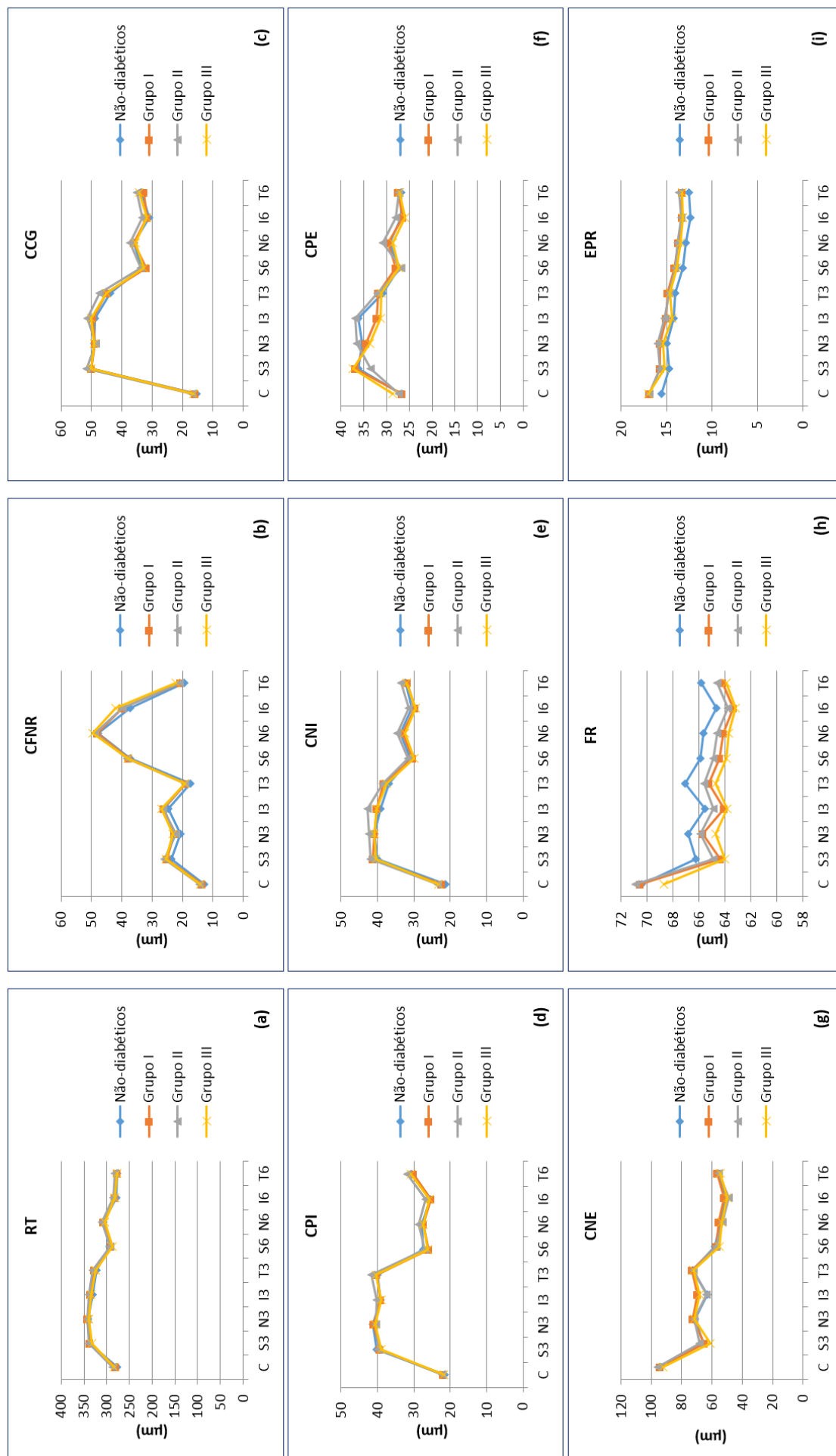


Figura 9 – Gráficos das diferentes espessuras das camadas da retina nos quatro grupos.

Nos modelos de regressão linear múltipla, considerando a idade, o género, a PIO e o comprimento axial, após aplicadas as correções de *Bonferroni* para testes múltiplos, não se encontraram diferenças significativas relativamente à espessura da RT em todas as áreas ETDRS dos doentes diabéticos face aos não diabéticos. No entanto, os padrões de distribuição das diferentes camadas foram diferentes.

A espessura das camadas CFNR, CNI e da camada do EPR dos doentes diabéticos foi superior quando comparada com as do grupo não diabético. Este aumento só atingiu significância estatística num pequeno número de setores (setor T3 da CFNR, setor I3 do grupo II da CNI e setor T6 dos grupos I e II da camada do EPR) (ver informação detalhada nas Tabelas 17 a 19 onde se encontram os resultados dos modelos de regressão linear múltipla para as três camadas referidas).

Tabela 17 - Modelos de regressão multivariáveis para a espessura da camada de fibras nervosas da retina

Modelo*	Coeficiente estimado	Valor p	Intervalo de Confiança de 95%	
Variável dependente: espessura da CFNR no setor C				
Género	1.150	0.001	0.466	1.835
Grupo I	0.699	0.125	-0.190	1.587
Grupo II	1.170	0.020	0.193	2.146
Grupo III	0.899	0.092	-0.142	1.939
Variável dependente: espessura da CFNR no setor S3				
Género	0.388	0.510	-0.764	1.541
Grupo I	1.220	0.111	-0.271	2.712
Grupo II	2.026	0.016	0.390	3.663
Grupo III	1.521	0.085	-0.199	3.241
Variável dependente: espessura da CFNR no setor I3				
Género	1.406	0.022	0.215	2.597
Grupo I	1.216	0.126	-0.333	2.766
Grupo II	1.583	0.070	-0.119	3.284
Grupo III	2.256	0.015	0.454	4.059
Variável dependente: espessura da CFNR no setor T3				
Género	0.465	0.088	-0.067	0.996
Grupo I	1.435	< 0.001	0.744	2.126
Grupo II	1.633	< 0.001	0.876	2.389
Grupo III	1.640	< 0.001	0.843	2.437
Variável dependente: espessura da CFNR no setor N3				
Género	1.025	0.033	0.089	1.960
Grupo I	1.756	0.005	0.543	2.970
Grupo II	1.395	0.042	0.063	2.727
Grupo III	2.286	0.002	0.879	3.693
Variável dependente: espessura da CFNR no setor I6				
Género	-0.821	0.465	-3.018	1.376
Grupo I	2.382	0.104	-0.476	5.239
Grupo II	2.752	0.087	-0.385	5.888
Grupo III	4.825	0.005	1.492	8.159
Variável dependente: espessura da CFNR no setor T6				
Género	0.234	0.615	-0.676	1.143
Grupo I	1.033	0.089	-0.150	2.216
Grupo II	1.352	0.043	0.053	2.651
Grupo III	2.438	0.001	1.060	3.815

*Categorias de referência: género feminino e grupo não diabético; CFNR - Camada de Fibras Nervosas da Retina; valores p obtidos através de modelos aditivos generalizados.

Tabela 18 - Modelos de regressão multivariáveis para a espessura da camada nuclear interna

Modelo*	Coefficiente estimado	Valor p	Intervalo de Confiança de 95%	
Variável dependente: espessura da CNI no setor S3				
Género	1.058	0.101	-0.198	2.314
Grupo I	1.667	0.047	0.034	3.300
Grupo II	2.268	0.014	0.474	4.061
Grupo III	0.890	0.359	-1.008	2.788
Variável dependente: espessura da CNI no setor I3				
Género	1.168	0.064	-0.058	2.394
Grupo I	0.959	0.239	-0.632	2.550
Grupo II	3.171	< 0.001	1.421	4.921
Grupo III	0.941	0.321	-0.911	2.793
Variável dependente: espessura da CNI no setor T3				
Género	1.429	0.017	0.267	2.591
Grupo I	1.451	0.062	-0.061	2.962
Grupo II	1.748	0.041	0.089	3.407
Grupo III	0.662	0.463	-1.101	2.425

*Categorias de referência: gênero feminino e grupo não diabético; CNI - Camada Nuclear Interna; valores p obtidos através de modelos aditivos generalizados.

Tabela 19 - Modelos de regressão multivariáveis para a espessura da camada do epitélio pigmentado da retina

Modelo*	Coeficiente estimado	Valor p	Intervalo de Confiança de 95%	
Variável dependente: espessura da camada do EPR no setor C				
Espessura da coróide	0.002	0.541	-0.004	0.007
Género	-0.614	0.093	-1.326	0.097
Grupo I	1.118	0.020	0.187	2.050
Grupo II	1.289	0.015	0.260	2.319
Grupo III	1.456	0.009	0.379	2.533
Variável dependente: espessura da camada do EPR no setor S3				
Espessura da coróide	0.007	0.002	0.003	0.011
Género	0.007	0.980	-0.539	0.554
Grupo I	0.804	0.028	0.092	1.516
Grupo II	0.838	0.038	0.052	1.624
Grupo III	0.585	0.167	-0.242	1.413
Variável dependente: espessura da camada do EPR no setor I3				
Espessura da coróide	0.007	0.002	0.003	0.011
Género	-0.090	0.747	-0.639	0.458
Grupo I	0.805	0.027	0.100	1.510
Grupo II	0.935	0.019	0.161	1.709
Grupo III	0.399	0.337	-0.413	1.211
Variável dependente: espessura da camada do EPR no setor T3				
Espessura da coróide	0.006	0.001	0.003	0.010
Género	-0.144	0.510	-0.572	0.284
Grupo I	0.627	0.030	0.065	1.188
Grupo II	0.598	0.060	-0.020	1.215
Grupo III	0.685	0.040	0.038	1.332
Variável dependente: espessura da camada do EPR no setor N3				
Espessura da coróide	0.005	0.018	0.001	0.009
Género	-0.287	0.307	-0.836	0.262
Grupo I	0.712	0.054	-0.006	1.430
Grupo II	1.068	0.009	0.276	1.861
Grupo III	0.550	0.195	-0.279	1.379
Variável dependente: espessura da camada do EPR no setor S6				
Género	0.034	0.880	-0.403	0.470
Grupo I	0.820	0.005	0.251	1.389
Grupo II	0.758	0.018	0.134	1.382
Grupo III	0.637	0.060	-0.023	1.296
Variável dependente: espessura da camada do EPR no setor I6				
Género	-0.053	0.795	-0.456	0.349
Grupo I	0.794	0.003	0.270	1.318
Grupo II	0.932	0.002	0.357	1.507
Grupo III	0.737	0.019	0.126	1.348
Variável dependente: espessura da camada do EPR no setor T6				
Género	-0.398	0.028	-0.749	-0.047
Grupo I	0.877	< 0.001	0.419	1.334
Grupo II	1.206	< 0.001	0.704	1.708
Grupo III	0.838	0.002	0.308	1.369
Variável dependente: espessura da camada do EPR no setor N6				
Género	-0.053	0.817	-0.502	0.396
Grupo I	0.919	0.002	0.334	1.505
Grupo II	1.016	0.002	0.376	1.656
Grupo III	0.676	0.054	-0.006	1.358

*Categorias de referência: género feminino e grupo não diabético; EPR - Epitélio Pigmentado da Retina; valores p obtidos através de modelos aditivos generalizados.

Curiosamente, a diferença mais consistente verificou-se ao nível da camada de FR, com uma espessura menor nos doentes diabéticos quando comparada com os não diabéticos (Tabela 20). No entanto, o padrão de espessura da camada de FR não foi linear em função da duração da doença. Após estratificação dos doentes diabéticos de acordo com este parâmetro, observou-se que as menores espessuras foram encontradas nos doentes dos extremos da duração da doença (diabéticos com menor e maior tempo de diagnóstico – grupos I e III, respetivamente – $p < 0.001$). Por outro lado, nos doentes com duração moderada da doença (grupo II) esta diminuição não atingiu significância estatística quando comparada com a dos controlos não diabéticos (Tabela 20).

As camadas restantes (CNE, CPE, CPI e CCG) mostraram uma tendência geral no sentido de maior espessura nos doentes diabéticos quando comparadas com os indivíduos não diabéticos, não tendo sido, no entanto, alcançada significância estatística.

Tabela 20 - Modelos de regressão multivariáveis para a espessura da camada de fotorretores

Modelo*	Coeficiente estimado	Valor p	Intervalo de Confiança de 95%	
Variável dependente: espessura da camada de FR no setor S3				
Espessura da coróide	0.005	0.096	-0.001	0.011
Género	0.339	0.373	-0.404	1.082
Grupo I	-2.096	< 0.001	-3.067	-1.124
Grupo II	-1.582	0.004	-2.650	-0.514
Grupo III	-2.324	< 0.001	-3.450	-1.197
Variável dependente: espessura da camada de FR no setor I3				
Espessura da coróide	0.000	0.880	-0.005	0.006
Género	0.277	0.407	-0.375	0.928
Grupo I	-1.535	< 0.001	-2.374	-0.695
Grupo II	-0.720	0.131	-1.650	0.211
Grupo III	-1.744	< 0.001	-2.726	-0.762
Variável dependente: espessura da camada de FR no setor T3				
Espessura da coróide	0.005	0.181	-0.002	0.012
Género	0.131	0.753	-0.684	0.946
Grupo I	-2.059	< 0.001	-3.132	-0.987
Grupo II	-1.678	0.006	-2.854	-0.501
Grupo III	-2.448	< 0.001	-3.684	-1.213
Variável dependente: espessura da camada de FR no setor N3				
Espessura da coróide	0.004	0.214	-0.002	0.010
Género	0.525	0.180	-0.240	1.289
Grupo I	-1.311	0.010	-2.301	-0.321
Grupo II	-1.283	0.025	-2.390	-0.175
Grupo III	-2.048	< 0.001	-3.203	-0.894
Variável dependente: espessura da camada de FR no setor S6				
Género	0.354	0.290	-0.300	1.008
Grupo I	-1.685	< 0.001	-2.531	-0.838
Grupo II	-1.229	0.011	-2.164	-0.295
Grupo III	-2.291	< 0.001	-3.282	-1.301
Variável dependente: espessura da camada de FR no setor I6				
Género	0.364	0.248	-0.250	0.978
Grupo I	-1.293	0.002	-2.091	-0.494
Grupo II	-0.842	0.062	-1.719	0.035
Grupo III	-1.456	0.003	-2.387	-0.524
Variável dependente: espessura da camada de FR no setor T6				
Género	0.351	0.297	-0.307	1.009
Grupo I	-1.704	< 0.001	-2.560	-0.848
Grupo II	-1.262	0.009	-2.202	-0.322
Grupo III	-1.984	< 0.001	-2.981	-0.986
Variável dependente: espessura da camada de FR no setor N6				
Género	0.582	0.050	0.004	1.160
Grupo I	-1.569	< 0.001	-2.321	-0.818
Grupo II	-1.075	0.012	-1.900	-0.250
Grupo III	-1.920	< 0.001	-2.797	-1.044

*Categorias de referência: género feminino e grupo não diabético; FR - Fotorretores; valores p obtidos através de modelos aditivos generalizados.

3.2. Visita V2

3.2.1. Análise exploratória da espessura da retina

Neste estudo foi feita a análise comparativa entre os doentes diabéticos que desenvolveram sinais clínicos de RD e os doentes que não apresentaram qualquer alteração fundoscópica. Analisando quer a espessura total quer a segmentação das 8 camadas da retina, na visita V2, verificou-se que o grupo de doentes que desenvolveu RD apresentou valores menores em todas as áreas ETDRS a nível da espessura da RT, assim como da CFNR, CCG, CPI, CNE, camada de FR e do EPR e em determinados setores da CNI (setores S3, T3, I3 e T6) e CPE (setores S3, T3, S6, T6 e N6) (Figura 10).

No entanto, esta diferença só atingiu significância estatística a nível da espessura da RT (setores C, S3, T3 e N3; $p = 0.009$ a 0.034), CGC (setor C; $p = 0.014$), CPE (setor S6; $p = 0.032$) e CNE (setor C; $p = 0.035$).

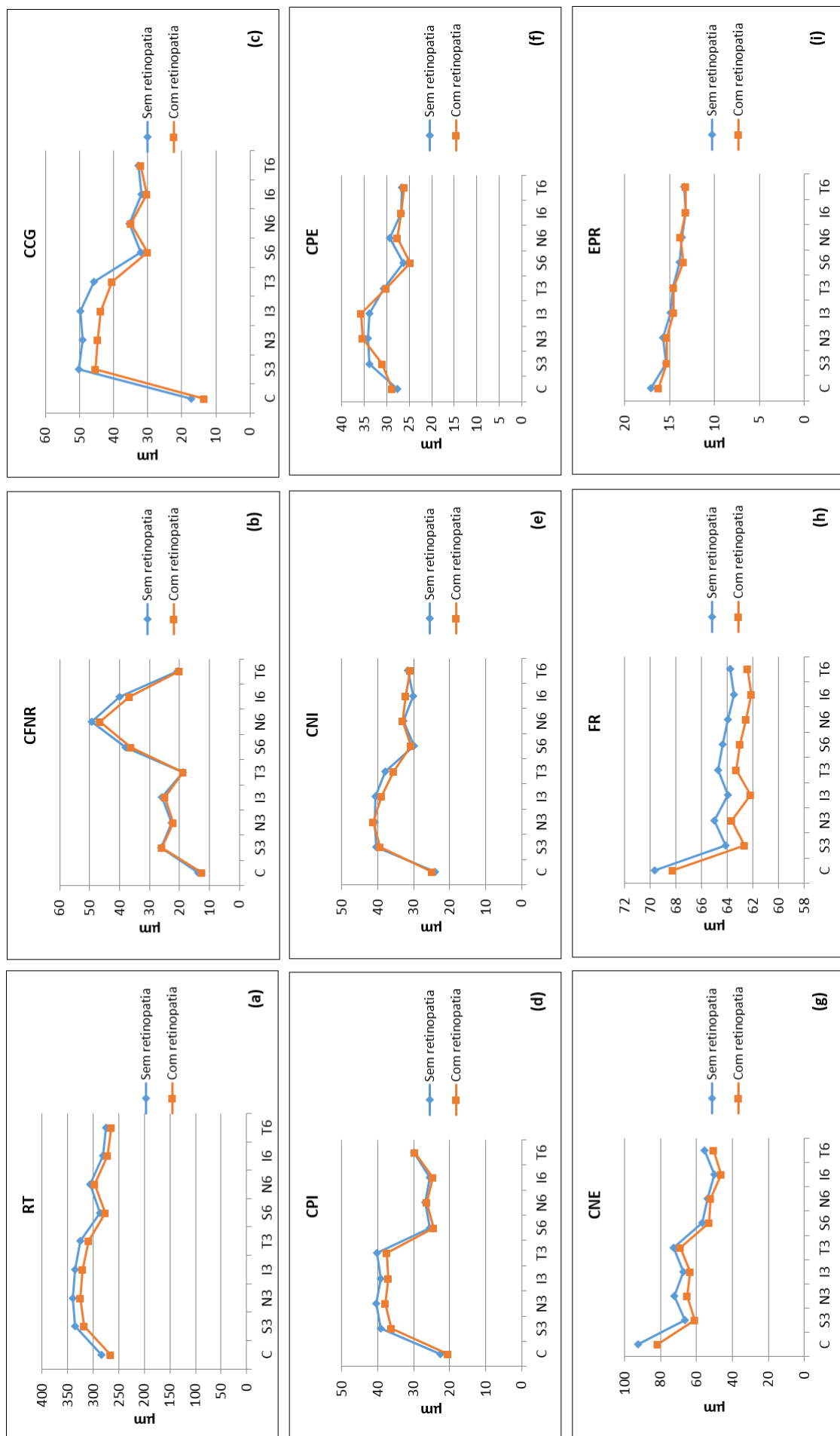


Figura 10 - Gráficos das diferentes espessuras das camadas da retina nos doentes diabéticos com e sem retinopatia diabética, visita V2.

Relativamente à análise da diferença entre as espessuras das camadas da retina obtidas nas visitas V2 e V1, verificou-se uma tendência consistente para um decréscimo dos valores das espessuras de RT e FR, em todas as áreas ETDRS. Esta diminuição foi maior nos doentes com RD, sem, no entanto, ter alcançado significância estatística (diferença para a RT de -0.012 a 0.001 μm versus -0.021 a -0.012 μm ; diferença para a camada de FR de -0.008 a -0.002 μm versus -0.025 a -0.009 μm) (Tabela 21).

Tabela 21 - Diferenças entre as espessuras da retina total e da camada de fotorreceptores obtidas nas visitas V2 e V1 (μm) nas áreas ETDRS no Grupo Diabético

	Doentes diabéticos sem RD (n=94)	Doentes diabéticos com RD (n=9)	Valor p
Espessura de RT			
Setor central	0.0005 (0.018)	-0.001 (0.031)	0.979
Setor Superior 3 mm	-0.006 (0.011)	-0.016 (0.025)	0.205
Setor Temporal 3 mm	-0.006 (0.017)	-0.015 (0.023)	0.619
Setor Inferior 3 mm	-0.005 (0.011)	-0.013 (0.023)	0.506
Setor Nasal 3 mm	-0.004 (0.013)	-0.015 (0.023)	0.152
Setor Superior 6 mm	-0.009 (0.020)	-0.013 (0.026)	0.807
Setor Temporal 6 mm	-0.012 (0.031)	-0.021 (0.020)	0.097
Setor Inferior 6 mm	-0.003 (0.022)	-0.002 (0.018)	0.676
Setor Nasal 6 mm	-0.007 (0.026)	-0.012 (0.024)	0.929
Espessura da camada de FR			
Setor central	-0.008 (0.045)	-0.009 (0.075)	0.771
Setor Superior 3 mm	-0.006 (0.027)	-0.019 (0.036)	0.368
Setor Temporal 3 mm	-0.006 (0.028)	-0.025 (0.052)	0.428
Setor Inferior 3 mm	-0.005 (0.030)	-0.018 (0.035)	0.293
Setor Nasal 3 mm	-0.008 (0.028)	-0.011 (0.041)	0.749
Setor Superior 6 mm	-0.003 (0.026)	-0.010 (0.023)	0.576
Setor Temporal 6 mm	-0.008 (0.026)	-0.018 (0.036)	0.453
Setor Inferior 6 mm	-0.002 (0.028)	-0.012 (0.023)	0.220
Setor Nasal 6 mm	-0.006 (0.026)	-0.010 (0.030)	0.859

Resultados expressos com média (DP). Valores p obtidos pelo teste de *Mann-Whitney*. ETDRS - *Early Treatment Diabetic Retinopathy Study*, RD - Retinopatia Diabética, RT - Retina Total, FR - Fotorreceptores.

3.2.2. Associações entre a espessura da retina e fatores sistêmicos e oculares

Após terem sido aplicados modelos de regressão linear múltiplos de efeitos mistos observou-se que a variável RD esteve associada de forma negativa com a espessura de RT (setores central, S3, T3, I3 e N3) ($p = 0.004$ a $p = 0.024$), CNE (setores T6 e I6) ($p = 0.007$ e $p = 0.009$) e camada de FR (setor N6) ($p = 0.038$) (Tabelas 22, 28 e 29). No intervalo de apenas um ano, a presença de RD fez diminuir a espessura da RT nas localizações referidas entre 13.04 a 16.63 μm . Contudo a variável RD não teve significado estatístico nos modelos das restantes camadas da retina, assim como perdeu significado nas camadas e setores referidos após aplicação das correções de *Bonferroni*.

Na visita V2 relativamente a V1 verificou-se diminuição da espessura da RT (setores S3, T3, I3, N3, S6, T6 e N6), CCG (setores S3, I3, S6, T6 e N6), CPI (setores S3, T3, N3, S6, T6 e N6), CNI (setores S3, T3, T6 e N6), CPE (setores S3, S6 e T6), CNE (setores C e I6) e camada de FR (setores S3, T3, I3, N3, T6 e N6) (Tabelas 22, 24-29). Contrariamente, a espessura da CFNR (S3, S6 e N6) e a espessura das CCG e CNI (ambas no setor central) apresentaram valores maiores na visita V2 que na V1.

No entanto, após a aplicação das correções de *Bonferroni*, esta tendência positiva só se mantém para a espessura da CFNR num único setor (setor S3). Usando a mesma correção estatística, a tendência negativa restringiu-se à espessura das CCG (setores I3 e N6), CPI (setores S6 e N6), CNI (setores T6 e N6), CPE (setor S6) e espessura total da retina (setores S3, I3, N3, S6 e T6) ($p < 0.001$). Após o seguimento de apenas 1 ano, a espessura total da retina diminuiu em média entre 1.74 a 3.26 μm , nos doentes diabéticos, independentemente de terem desenvolvido ou não RD.

Tabela 22 - Modelos de regressão multivariáveis para a espessura da retina total (Visita V2)

Modelo*	Coefficiente estimado	Valor p	Intervalo de Confiança de 95%	
Variável dependente: espessura da RT no setor central				
Δ Espessura RT V2-V1	0.039	0.940	-0.975	1.053
Género	11.906	0.004	3.723	20.090
Retinopatia diabética	-16.627	0.024	-31.111	-2.143
Variável dependente: espessura da RT no setor S3				
Δ Espessura RT V2-V1	-2.129	< 0.001	-2.994	-1.264
Género	9.707	0.004	3.179	16.235
Retinopatia diabética	-15.740	0.004	-26.568	-4.911
PIO	0.747	0.021	0.111	1.383
Comprimento axial	-7.193	< 0.001	-11.075	-3.310
Variável dependente: espessura da RT no setor T3				
Δ Espessura RT V2-V1	-1.947	0.001	-3.052	-0.842
Género	10.537	0.001	4.319	16.756
Retinopatia diabética	-13.354	0.011	-23.601	-3.108
PIO	0.923	0.011	0.213	1.633
Comprimento axial	-5.093	0.007	-8.765	-1.421
Variável dependente: espessura da RT no setor I3				
Δ Espessura RT V2-V1	-1.922	< 0.001	-2.752	-1.093
Género	6.934	0.030	0.680	13-188
Retinopatia diabética	-13.195	0.014	-23.753	-2.636
Comprimento axial	-5.151	0.008	-8.941	-1.362
Variável dependente: espessura da RT no setor N3				
Δ Espessura RT V2-V1	-1.738	< 0.001	-2.665	-0.811
Retinopatia diabética	-13.038	0.022	-24.229	-1.848
Variável dependente: espessura da RT no setor S6				
Δ Espessura RT V2-V1	-2.708	< 0.001	-3.981	-1.436
Idade	-0.467	0.002	-0.763	-0.171
Equivalente esférico	2.686	0.004	0.840	4.532
Variável dependente: espessura da RT no setor T6				
Δ Espessura RT V2-V1	-3.256	< 0.001	-5.055	-1.457
Género	-0.309	0.021	-0.571	-0.046
Idade	6.079	0.014	1.225	10.932
PIO	1.082	0.003	0.372	1.791
Equivalente esférico	2.036	0.015	0.403	3.669
Variável dependente: espessura da RT no setor N6				
Δ Espessura RT V2-V1	-2.340	0.002	-3.851	-0.828
Idade	-0.370	0.036	-0.717	-0.024
Comprimento axial	-5.457	0.005	-9.237	-1.677

*Categorias de referência: medição da espessura na visita 1, gênero feminino, grupo sem retinopatia diabética; Δ Espessura RT V2-V1: corresponde à diferença, em média, da espessura da retina total entre a visita V2 e V1; RT - Retina Total, PIO - Pressão Intraocular; valores p obtidos através de modelos lineares generalizados de efeitos mistos.

Tabela 23 - Modelos de regressão para a espessura da camada de fibras nervosas da retina (Visita V2)

Modelo*	Coefficiente estimado	Valor p	Intervalo de Confiança de 95%	
Variável dependente: espessura da CFNR no setor S3				
Δ Espessura CFNR V2-V1	0.883	< 0.001	0.435	1.332
Variável dependente: espessura da CFNR no setor S6				
Δ Espessura CFNR V2-V1	0.612	0.013	0.129	1.094
Variável dependente: espessura da CFNR no setor N6				
Δ Espessura CFNR V2-V1	1.437	0.006	0.407	2.467

*Categorias de referência: medição da espessura na visita 1; Δ Espessura CFNR V2-V1: corresponde à diferença, em média, da espessura da camada de fibras nervosas da retina entre a visita V2 e V1; CFNR - Camada de Fibras Nervosas da Retina; valores p obtidos através de modelos lineares generalizados de efeitos mistos.

Tabela 24 - Modelos de regressão multivariáveis para a espessura da camada de células gnglionares (Visita V2)

Modelo*	Coefficiente estimado	Valor p	Intervalo de Confiança de 95%	
Variável dependente: espessura da CCG no setor central				
Δ Espessura CCG V2-V1	0.551	0.002	0.195	0.907
Gênero	1.837	0.035	0.129	3.545
HbA1c	0.859	0.033	0.069	1.648
PAM	-0.032	0.007	-0.056	-0.009
Variável dependente: espessura da CCG no setor S3				
Δ Espessura CCG V2-V1	-0.495	0.002	-0.812	-0.178
Idade	-0.211	< 0.001	-0.321	-0.100
Comprimento axial	-0.983	0.110	-2.190	0.224
Variável dependente: espessura da CCG no setor I3				
Δ Espessura CCG V2-V1	-0.796	< 0.001	-1.112	-0.480
Idade	-0.220	< 0.001	-0.335	-0.105
Variável dependente: espessura da CCG no setor S6				
Δ Espessura CCG V2-V1	-0.806	0.002	-1.306	-0.305
Idade	-0.142	< 0.001	-0.214	-0.070
Variável dependente: espessura da CCG no setor T6				
Δ Espessura CCG V2-V1	-0.695	0.004	-1.164	-0.226
Idade	-0.147	0.001	-0.233	-0.062
Duração	0.010	0.032	0.001	0.019
PIO	0.219	0.044	0.006	0.431
Variável dependente: espessura da CCG no setor N6				
Δ Espessura CCG V2-V1	-0.932	< 0.001	-1.431	-0.433
Idade	-0.164	< 0.001	-0.251	-0.077

*Categorias de referência: medição da espessura na visita 1, gênero feminino; Δ Espessura CCG V2-V1: corresponde à diferença, em média, da espessura da camada de células ganglionares entre a visita V2 e V1; CCG - Camada de Células Ganglionares, HbA1c - Hemoglobina Glicada, PAM - Pressão Arterial Média, PIO - Pressão Intraocular; valores p obtidos através de modelos lineares generalizados de efeitos mistos.

Tabela 25 - Modelos de regressão multivariáveis para a espessura da camada plexiforme interna (Visita V2)

Modelo*	Coeficiente estimado	Valor p	Intervalo de Confiança de 95%	
Variável dependente: espessura da CPI no setor S3				
Δ Espessura CPI V2-V1	-0.410	0.033	-0.786	-0.034
Idade	-0.188	< 0.001	-0.262	-0.115
PIO	0.204	0.028	0.022	0.385
Variável dependente: espessura da CPI no setor T3				
Δ Espessura CPI V2-V1	-0.416	0.036	-0.805	-0.027
Idade	-0.125	0.003	-0.207	-0.043
PAM	-0.027	0.037	-0.052	-0.002
Variável dependente: espessura da CPI no setor N3				
Δ Espessura CPI V2-V1	-0.579	0.020	-1.065	-0.092
Idade	-0.140	< 0.001	-0.218	-0.061
HbA1c	-1.016	0.035	-1.959	-0.073
PIO	0.245	0.017	0.044	0.447
PAM	-0.032	0.036	-0.062	-0.002
Variável dependente: espessura da CPI no setor S6				
Δ Espessura CPI V2-V1	-0.738	< 0.001	-1.085	-0.391
Idade	-0.101	0.001	-0.158	-0.044
Variável dependente: espessura da CPI no setor T6				
Δ Espessura CPI V2-V1	-0.490	0.008	-0.850	-0.130
Idade	-0.104	< 0.001	-0.161	-0.047
Gênero	1.188	0.028	0.129	2.248
Duração	0.008	0.009	0.002	0.014
PIO	0.170	0.028	0.018	0.322
Variável dependente: espessura da CPI no setor N6				
Δ Espessura CPI V2-V1	-0.883	< 0.001	-1.315	-0.451
Idade	-0.125	< 0.001	-0.193	-0.057

*Categorias de referência: medição da espessura na visita 1, gênero feminino; Δ Espessura CPI V2-V1: corresponde à diferença, em média, da espessura da camada plexiforme interna entre a visita V2 e V1; CPI - Camada Plexiforme Interna, HbA1c - Hemoglobina Glicada, PAM - Pressão Arterial Média, PIO - Pressão Intraocular; valores p obtidos através de modelos lineares generalizados de efeitos mistos.

Tabela 26 - Modelos de regressão multivariáveis para a espessura da camada nuclear interna (Visita V2)

Modelo*	Coeficiente estimado	Valor p	Intervalo de Confiança de 95%	
Variável dependente: espessura da CNI no setor central				
Δ Espessura CNI V2-V1	1.233	0.008	0.327	2.139
Idade	0.201	< 0.001	0.090	0.312
Gênero	2.980	0.003	0.982	4.978
Variável dependente: espessura da CNI no setor S3				
Δ Espessura CNI V2-V1	-0.806	0.009	-1.415	-0.197
Variável dependente: espessura da CNI no setor T3				
Δ Espessura CNI V2-V1	-0.546	0.053	-1.099	0.007
Equivalente esférico	0.516	0.023	0.072	0.960
Variável dependente: espessura da CNI no setor T6				
Δ Espessura CNI V2-V1	-0.685	< 0.001	-1.007	-0.362
Idade	-0.050	0.044	-0.099	-0.001
Equivalente esférico	0.318	0.041	0.013	0.624
Variável dependente: espessura da CNI no setor N6				
Δ Espessura CNI V2-V1	-0.544	< 0.001	-0.850	-0.238
Idade	-0.059	0.041	-0.115	-0.003

*Categorias de referência: medição da espessura na visita 1, gênero feminino; Δ Espessura CNI V2-V1: corresponde à diferença, em média, da espessura da camada nuclear interna entre a visita V2 e V1; CNI - Camada Nuclear Interna; valores p obtidos através de modelos lineares generalizados de efeitos mistos.

Tabela 27 - Modelos de regressão multivariáveis para a espessura da camada plexiforme externa (Visita V2)

Modelo*	Coeficiente estimado	Valor de p	Intervalo de Confiança de 95%	
Variável dependente: espessura da CPE no setor S3				
Δ Espessura CPE V2-V1	-2.165	0.007	-3.726	-0.604
Variável dependente: espessura da CPE no setor S6				
Δ Espessura CPE V2-V1	-1.039	< 0.001	-1.607	-0.471
Variável dependente: espessura da CPE no setor T6				
Δ Espessura CPE V2-V1	-0.479	0.012	-0.855	-0.103
Equivalente esférico	0.428	0.002	0.159	0.697

*Categorias de referência: medição da espessura na visita 1; Δ Espessura CPE V2-V1: corresponde à diferença, em média, da espessura da camada plexiforme externa entre a visita V2 e V1; CPE - Camada Plexiforme Externa; valores p obtidos através de modelos lineares generalizados de efeitos mistos.

Tabela 28 - Modelos de regressão multivariáveis para a espessura da camada nuclear externa (Visita V2)

Modelo	Coeficiente estimado	Valor p	Intervalo de Confiança de 95%	
Variável dependente: espessura da CNE no setor central				
Δ Espessura CNE V2-V1	-2.456	0.001	-3.933	-0.979
Retinopatia diabética	-8.781	0.004	-14.718	-2.843
Variável dependente: espessura da CNE no setor T6				
Δ Espessura CNE V2-V1	-0.534	0.096	-1.163	0.095
Retinopatia diabética	-4.931	0.007	-8.523	-1.340
Comprimento axial	-1.676	0.008	-2.907	-0.446
Variável dependente: espessura da CNE no setor I6				
Δ Espessura CNE V2-V1	-0.728	0.008	-1.264	-0.193
Retinopatia diabética	-4.382	0.009	-7.670	-1.095
Comprimento axial	-2.453	< 0.001	-3.580	-1.327

*Categorias de referência: medição da espessura na visita 1, grupo sem retinopatia diabética; Δ Espessura CNE V2-V1: corresponde à diferença, em média, da espessura da camada nuclear externa entre a visita V2 e V1; CNE - Camada Nuclear Externa; valores p obtidos através de modelos lineares generalizados de efeitos mistos.

Tabela 29 - Modelos de regressão multivariáveis para a espessura da camada de fotorreceptores (Visita V2)

Modelo*	Coeficiente estimado	Valor p	Intervalo de Confiança de 95%	
Variável dependente: espessura da camada de FR no setor S3				
Δ Espessura FR V2-V1	-0.476	0.008	-0.826	-0.125
Variável dependente: espessura da camada de FR no setor T3				
Δ Espessura FR V2-V1	-0.498	0.013	-0.890	-0.107
Género	1.487	0.001	0.633	2.341
PIO	0.174	0.005	0.051	0.297
Comprimento axial	-0.542	0.032	-1.040	-0.045
Variável dependente: espessura da camada de FR no setor I3				
Δ Espessura FR V2-V1	-0.456	0.022	-0.848	-0.065
Retinopatia diabética	-1.284	0.045	-2.540	-0.027
Variável dependente: espessura da camada de FR no setor N3				
Δ Espessura FR V2-V1	-0.573	0.003	-0.946	-0.199
Género	1.189	0.005	0.360	2.019
Comprimento axial	-0.560	0.029	-1.063	-0.057
Variável dependente: espessura da camada de FR no setor T6				
Δ Espessura FR V2-V1	-0.592	0.001	-0.933	-0.251
Género	0.731	0.041	0.030	1.433
Variável dependente: espessura da camada de FR no setor N6				
Δ Espessura FR V2-V1	-0.408	0.013	-0.729	-0.087
Género	0.686	0.040	0.030	1.341
Retinopatia diabética	-1.229	0.038	-2.388	-0.069

*Categorias de referência: medição da espessura na visita 1, grupo sem retinopatia diabética; Δ Espessura FR V2-V1: corresponde à diferença, em média, da espessura de fotorreceptores entre a visita V2 e V1; FR - Fotorreceptores; valores p obtidos através de modelos lineares generalizados de efeitos mistos.

CAPÍTULO V – DISCUSSÃO

Este estudo identificou, numa primeira observação, uma tendência para aumento da espessura da coróide e uma diminuição significativa da camada de FR de doentes diabéticos sem RD comparativamente com indivíduos não diabéticos. Ao longo de um ano, que espaçou os dois momentos de avaliação, os doentes diabéticos mantiveram o aumento da espessura da coróide e revelaram não só a continuação da diminuição da camada de FR, assim como uma diminuição da espessura de RT e das camadas mais internas da retina (CCG, CPI e CNI). Durante este período de tempo de 1 ano, 8.7% dos doentes diabéticos desenvolveram RD e nestes, a espessura da coróide apresentou um aumento menor assim como a diminuição da espessura da RT e FR foi mais acentuada relativamente aos que não desenvolveram RD.

A função retiniana depende da sinergia de múltiplos neurónios, incluindo não só os FR, células bipolares e horizontais, células amácrinas, ganglionares, células da glia (astrócitos e células de Müller), assim como as BHR interna (células endoteliais e pericitos) e externa (vasos coróides e EPR) que medeiam o suprimento de nutrientes e controlam o fluxo iónico ²¹⁸. Esta complexa rede funcional da retina parece adaptar-se a um conjunto de alterações metabólicas causadas pela diabetes, permitindo aos doentes manterem a sua boa função visual assim como não serem portadores de RD clinicamente visível durante cerca de 5-10 anos após o diagnóstico de DM. Contudo, a complexidade e as necessidades metabólicas elevadas da retina originam uma perda da homeostasia na presença de diabetes, não se sabendo, no entanto, onde se inicia a disrupção desta cadeia funcional. Matea e Newman ²¹⁹ foram os primeiros a aplicar o conceito de unidade neurovascular para descrever as interações funcionais e estruturais entre os neurónios, células gliais e vasculares na retina interna. Os FR e as células de Müller recebem os nutrientes e eliminam os produtos do seu metabolismo via coróide através do EPR. Curiosamente, o tecido retiniano externo, mais rico em oxigénio, é desprovido de vasos retinianos ao contrário das camadas mais internas. Na retina interna, assim como no sistema nervoso central, o *coupling* neurovascular regula o fluxo sanguíneo, permitindo o aporte de oxigénio e nutrientes necessário aquando existe atividade metabólica e elétrica intensas. As barreiras sanguíneas controlam o fluxo iónico, protegendo a retina interna do influxo de proteínas plasmáticas e regulando a resposta inflamatória. Esta diferença de regulação entre a retina interna e externa pode explicar as alterações significativas verificadas precocemente na camada de FR dos doentes diabéticos sem RD comparativamente com indivíduos não diabéticos.

Foi também identificada uma tendência para o aumento da espessura da coróide nos doentes diabéticos sem RD relativamente aos não diabéticos. A autorregulação da coróide é um tema controverso, tal como já referido, alguns autores demonstraram que a coróide não tem autorregulação quando o gradiente da pressão de perfusão é diminuído por aumento da PIO^{171,178}. Para além disso, pode existir uma diminuição do fluxo sanguíneo coroideu mesmo na ausência de RD²²⁰. Esta ausência de autorregulação e o aumento do índice de resistência da coróide em doentes diabéticos pode originar um edema coroideu, ou uma menor elasticidade vascular com aumento do diâmetro vascular que justificaria o aumento da espessura deste tecido identificado no presente estudo. Por sua vez, a coróide afetada nestes doentes diabéticos sem RD, prejudicará as funções dos FR uma vez que esta permite o seu suporte nutricional.

Numa situação de hiperglicemia crónica, o tecido coroideu acabará por sofrer atrofia vascular com tendência para a diminuição da sua espessura, conforme verificado nos doentes que desenvolveram RD.

As contínuas alterações bioquímicas, características da diabetes, acabarão por afetar a unidade neurovascular da retina causando disfunção celular por excitotoxicidade provocada pelo excesso de glutamato, perda dos fatores neuroprotetores, stress oxidativo e processos neuroinflamatórios. Histologicamente, esta perda de autorregulação da retina interna traduz-se em atividade glial aumentada e em apoptose das células ganglionares da retina²²¹. Estas alterações celulares apoiam o resultado de diminuição da espessura das camadas mais internas da retina, assim como da espessura de RT verificado neste estudo longitudinal, ao fim de um ano de seguimento de doentes diabéticos sem RD com mediana de duração de DM de 60 meses (IQR: 30.0-126.0; R: 1.00-360.0). No entanto, a presença de RD associou-se de forma negativa com a espessura de RT e de FR, fotorreceptores estes que primeiramente sofreram processos apoptóticos. A pequena percentagem de doentes que desenvolveram RD não permite conclusões muito aprofundadas sobre a evolução das diferentes camadas da retina e coróide, apoiando, contudo, a tendência para a atrofia e posterior diminuição da coróide e manutenção da apoptose dos FR precocemente.

O OCT, exame complementar muito usado na prática clínica na observação de doentes diabéticos, permite-nos obter imagens da retina e coróide sobreponíveis a cortes histológicos, pelo que representa um método de diagnóstico útil nos doentes diabéticos mesmo quando ainda não desenvolveram RD clinicamente visível. A identificação de alterações tomográficas precoces nestes doentes introduz um novo paradigma na classificação da RD, nas possíveis terapêuticas neuroprotetoras e no seguimento destes doentes diabéticos. Assim, antes da presença de lesões vasculares fundoscopicamente observáveis, um conjunto de alterações na

unidade neurovascular da retina pode ser identificável através de um exame não-invasivo, fiável e facilmente reproduzível e que se encontra em constante evolução.

Os mecanismos fisiopatológicos desta patologia perspectivam a continuidade deste estudo, de forma a abrangermos mais variáveis que nos permitam sustentar a explicação para as alterações que se encontram na retina e na coróide. No entanto, salientamos que este trabalho de investigação incluiu 26 variáveis demográficas e clínicas e 94 variáveis estruturais da retina e coróide, sendo por isso um dos maiores estudos da área.

CORÓIDE

Neste estudo, numa primeira fase, a espessura da coróide, obtida através do SD-OCT, de doentes diabéticos sem RD foi comparada com a de indivíduos não diabéticos. Verificou-se uma tendência para o aumento da mesma em todas as localizações nos doentes diabéticos relativamente ao grupo não diabético. No entanto, esta diferença não se manteve significativa após a correção para testes múltiplos.

Diferentes autores, Esmaeelpour, Querques e Vujosevic *et al.* identificaram uma diminuição da espessura da coróide, independente do estadio da doença, ou seja, mesmo nos doentes diabéticos sem RD ^{196,222–224}. Se alguns estudos concluíram que a coroidopatia diabética pode preceder a RD ^{196,213}, outros não identificaram esta possível associação ^{225,226}. Contudo, as suas amostras eram relativamente pequenas (de 15, 21 e 22 doentes diabéticos sem RD ^{196,222,223}).

Xu *et al.*, no estudo Beijing que incluiu 246 doentes diabéticos, dos quais 23 tinham RD, reportou um aumento da espessura coróideia subfoveal que se associou positivamente com a DM. No entanto, após ajuste para os diferentes fatores de confundimento, esta diferença não se relacionou com a presença ou com o estadio de RD ²²⁷. Porém, há que referir algumas das limitações deste estudo. Primeiro, não foi considerada a variação diurna da espessura da coróide, dado que os exames tomográficos foram obtidos a diferentes horas do dia; segundo, foi escolhido sempre o mesmo olho; e por último, o diagnóstico de RD foi estabelecido somente por observação de retinografias.

Apesar dos resultados dos estudos referidos serem divergentes, devemos ter em conta o fato de as amostras de cada estadio da RD serem muito pequenas e insuficientes para garantir a precisão dos resultados obtidos a partir de análises multivariáveis.

O projeto desta tese tentou colmatar as limitações encontradas noutros estudos, considerando a seleção aleatória do olho, obtendo a confirmação laboratorial da doença e efetuando os exames tomográficos à mesma hora do dia. Na análise multivariável, após ajustamento para a idade, sexo, acuidade visual, PIO, APO, comprimento axial, equivalente esférico, PAM e hábitos farmacológicos, a espessura da coróide, em todas as localizações, manteve-se maior nos doentes diabéticos relativamente aos não diabéticos. Este aumento da espessura da coróide em doentes diabéticos sem RD pode estar relacionado com o edema coróideu secundário à DM, refletindo o possível início da coroidopatia diabética.

Quando analisamos o padrão da espessura da coróide ao longo das diferentes localizações, verificamos que, em ambos os grupos, a distribuição normal da espessura da coróide está

presente, sendo maior no quadrante superior que no inferior assim como no temporal relativamente ao nasal ¹⁸⁸.

A espessura da coróide associou-se de forma negativa com a idade em ambos os grupos, diminuindo entre 2.1 a 3.2 μm por cada ano de vida, resultado este que está de acordo com o descrito na literatura ^{188,228}.

No grupo dos diabéticos, para além da idade, foi identificada uma associação positiva entre a espessura da coróide e a APO, ou seja, a espessura da coróide aumentou em média entre 8.4 a 11.6 μm por cada mmHg de aumento na APO. A APO é definida como a diferença entre a PIO sistólica e diastólica e é resultado do fluxo sanguíneo ocular pulsátil da coróide, que representa cerca de 85% do fluxo de sangue ocular total ^{229,230}. Esta variável é dependente da dinâmica do sistema cardiovascular, da rigidez dos vasos oculares por um lado e das propriedades biomecânicas do olho por outro ²³¹. Esta associação entre a APO e a espessura da coróide, que não se verificou nos indivíduos não diabéticos, mostra que apesar de não haver diferenças significativas da espessura, este tecido vascular não é idêntico nos dois grupos. Vários fatores podem contribuir para esta diferença, uma maior rigidez vascular ou menor elasticidade nos doentes diabéticos, ou a própria esclera e córnea serem mais rígidas na DM e portanto mais atreitos a que a flutuação do volume a cada pulsação origine uma maior flutuação da pressão. Nesta segunda linha de raciocínio, a coróide nos diabéticos será igual e não a responsável por esta diferença. Contudo, novos estudos serão necessários para verificar estas hipóteses de forma a esclarecer os padrões de associação diferentes entre os dois grupos.

A espessura da coróide não se relacionou de forma linear com a duração da doença, controlo metabólico (glicemia e HbA1c) e PAM. Não obstante, é interessante analisar os correspondentes gráficos de dispersão destas variáveis.

No que diz respeito à duração da doença, a espessura da coróide (em todas as localizações) apresenta flutuação até 150 meses de duração da diabetes, aumentando nos primeiros 77 meses e diminuindo depois até aos 150 meses. Esta interessante relação não linear poderá ter uma explicação baseada na própria fisiopatologia da doença. Nesse prisma, este aumento de espessura pode ser uma das primeiras manifestações da descrita coroidopatia diabética, por possível edema ou extravasamento extravascular, seguido de uma diminuição da espessura, correspondente a um provável período de atrofia do tecido coróideu. Posteriormente, verifica-se uma tendência para a estabilização, a qual pode ser compatível com um estadio final de atrofia ou incapacidade por parte dos vasos em apresentar qualquer modulação. Este padrão de comportamento ao nível da coróide parece, assim, mimetizar as etapas da fisiopatologia de

morte celular noutros órgãos, em que a morte celular é acompanhada por dissipação de gradientes eletroquímicos de iões monovalentes através da membrana plasmática, podendo causar perturbações no volume celular. Em vários tipos de células, estímulos necróticos ou apoptóticos causam edema ou atrofia celular, respetivamente ²³². Yülek *et al.* analisaram 134 doentes diabéticos tipo 2 sem RD com EDI-OCT e classificaram-nos em 3 grupos de acordo com a duração da doença, grupo I (5-9 anos, n = 63), grupo II (10-14 anos, n = 37), grupo III (15-40 anos, n = 34), e concluíram que a espessura retiniana foveal diminuiu em doentes com maior duração de diabetes. No entanto, a espessura da coróide foveal não foi influenciada pela duração da doença sistémica ²³³. Contudo, para estas medições, que foram realizadas na área subfoveal e a 1500 µm nasal e temporal à fóvea, o grupo I tinha uma amostra duas vezes superior à dos grupos II e III.

Quanto à glicemia, verificou-se que a espessura da coróide se manteve estável com ligeira variação até 160 mg/dl, valor a partir do qual a espessura da coróide aumenta com o aumento da glicemia. Nos doentes diabéticos, elevados níveis sanguíneos de glicose aumentam o índice de resistência (IR) do fluxo sanguíneo coroídeo ²³⁴. A glicemia é um valor único, enquanto a HbA1c representa a média da concentração de glicose sanguínea dos últimos três meses. Assim, a ausência de variação da espessura da coróide com diferentes valores de HbA1c pode corresponder ao aumento do IR nos doentes diabéticos, o qual é mais significativo no estado glicémico crónico que no agudo.

A autorregulação da coróide é um tema controverso e não há certezas quanto às variações da espessura da coróide com a variação da PAS. Polska *et al.* defendem que os mecanismos de regulação do fluxo sanguíneo coroídeo ao nível da fóvea se associam melhor com o aumento da pressão arterial sanguínea do que com o aumento da PIO ¹⁸⁰. Os resultados deste estudo de Polska estão de acordo com as duas hipóteses de regulação do fluxo sanguíneo coroídeo, já anteriormente relatadas em estudos animais: regulação miogénica e neural ^{235,236}. A teoria miogénica afirma que se a pressão transmural for diminuída, o músculo liso vascular relaxa, resultando num aumento do diâmetro vascular que mantém a tensão da parede vascular constante. Desta forma, a capacidade de regulação da coróide pode não somente depender da pressão de perfusão ocular mas também ser influenciada pela forma de alteração da pressão de perfusão ocular. A capacidade de autorregulação da coróide é melhor em PIO mais baixas, indicando que há uma contribuição miogénica para este mecanismo de autorregulação. Sem esta contribuição haveria uma vasoconstrição em situações de PIO mais baixas para os mesmos aumentos da pressão de perfusão ocular. Para além disso, os resultados de Polska também suportaram a hipótese do componente neural envolvido nos mecanismos de regulação. Ao

contrário dos vasos retinianos, os vasos coroídeos são ricamente inervados ^{237,238}. A inervação simpática e parassimpática pode ser identificada na coróide ^{239,240} e contribui para as alterações na resistência vascular descritas. Os nervos simpáticos contêm o neuropeptídeo Y, como evidenciado em estudos de imunorreatividade ²³⁹. Assim, a estimulação do sistema simpático tem sido associada a uma pronunciada redução no fluxo sanguíneo em várias espécies ^{241–243}. Desta forma, tem sido colocada a hipótese de que o sistema nervoso simpático desempenha um papel na proteção da coróide contra o aumento da perfusão durante o aumento da pressão sanguínea ²⁴⁴.

Nos doentes diabéticos, Nagaoka *et al.* demonstraram que há uma diminuição do fluxo sanguíneo coroídeo mesmo na ausência de RD ²¹³. No presente projeto, relativamente à PAM, a espessura da coróide revelou menor flutuação nos doentes diabéticos do que nos não diabéticos, assim como se associou diretamente com PAM (principalmente em valores inferiores a 89 e superiores a 104 mmHg). Este comportamento nos doentes diabéticos possivelmente relacionar-se-á com o aumento do IR no fluxo sanguíneo coroídeo.

Após seguimento dos doentes diabéticos sem RD durante um ano verificou-se que 8.7% dos doentes desenvolveram RD, valor superior ao descrito na literatura, 4.6% de incidência a 1 ano publicado por Dutra Medeiros *et al.* ³⁵. Esta diferença pode ser explicada pelo facto de terem sido utilizados diferentes métodos de identificação da presença de RD, observação fundoscópica *versus* análise fotográfica e de os doentes que evoluíram para RD terem uma duração média de DM superior (168 meses).

Relativamente à espessura da coróide, esta manteve a sua tendência para aumentar nos doentes diabéticos independentemente de terem evoluído para RD ($p < 0.001$ a 0.003). Na visita V2, a espessura da coróide aumentou face a V1 entre 10.01 a 17.34 μm . Apesar de não haver significância estatística, quando comparamos os resultados dos doentes com e sem RD, observamos que o aumento da espessura da coróide é maior naqueles que não desenvolveram RD, 230.28 a 280.10 μm *versus* 217.00 a 269.56 μm .

Os músculos lisos das paredes vasculares da coróide são inervados por ambas as divisões do sistema nervoso autónomo, as quais formam densos plexos de fibras nervosas em torno dos vasos (plexos perivasculares). No entanto, tal como já referido, ao contrário da retina e da úvea anterior, o fluxo sanguíneo coroídeo pode não exibir capacidade de autorregulação ²⁴⁵. Assim, a neuropatia diabética que afetaria esta inervação coroídea, como a ausência de autorregulação ou o défice da mesma nos doentes diabéticos, iria justificar a coroidopatia diabética manifestada

pelo aumento da espessura da coróide numa fase inicial e, posteriormente, quando se inicia o desenvolvimento de RD, uma diminuição por atrofia da sua rede vascular.

Analisando novamente os estudos publicados até à data, quando comparada a espessura da coróide de doentes diabéticos com RDNP, EMD e RDP, identificou-se uma tendência para a sua diminuição na presença de RD ^{196,223,224,226,246,247}. No entanto, outros estudos revelaram um aumento da espessura da coróide na presença de RD ^{223,247,248}. Kim *et al.* para além deste aumento da espessura, verificaram uma tendência para o aumento da mesma de acordo com a gravidade da RD ²⁴⁸. No entanto, esta associação com a gravidade da retinopatia não foi verificada noutros estudos ^{226,227,247}. Kim *et al.*, em concordância com outros autores, reportaram ainda um aumento da espessura da coróide nos doentes com EMD face aos sem edema macular ^{196,224,226,246,247}. Em oposição, Gerendas *et al.* verificaram uma menor espessura da coróide tanto nos olhos com EDM como nos seus adelfos sem EMD, sugerindo que a doença sistémica será a principal causa desta diminuição da espessura ²⁴⁹. Na análise destes estudos devemos ter em conta se foram incluídos doentes que receberam tratamento laser ou anti-VEGF e qual o tempo que decorreu entre o tratamento e medição da espessura da coróide. Ambos os tratamentos levam a uma diminuição da espessura da coróide, no entanto, nos primeiros 1 a 3 meses pode haver um edema de origem inflamatória com aumento subjacente da sua espessura ^{196,224,246,247,250}.

Neste estudo, a avaliação da coróide teve algumas limitações. Primeiro, as medições da espessura da coróide foram realizadas manualmente. Contudo, esta segmentação manual tem demonstrado elevada reprodutibilidade intra e interobservador ²⁵¹. Segundo, o estado de hidratação dos doentes que pode afetar a espessura da coróide não foi tido em consideração. No entanto, foi diminuída a variabilidade circadiana através da realização de todos os exames à mesma hora do dia e no mesmo ambiente. Terceiro, deve haver algumas precauções quanto ao fato do grupo não diabético poder ter diabetes ou mesmo pré-diabetes não diagnosticados, condições estas que podem afetar a função vascular. Todavia, a análise da plataforma de dados de saúde para verificar os registos clínicos dos centros de saúde destes doentes, permitiu excluir os doentes com TDG e AGJ. Além disso, uma limitação inerente a este tipo de estudos diz respeito à duração da doença. Dado que o seu início (particularmente da DM tipo 2) é insidioso e os doentes só o podem relatar após o seu diagnóstico, a duração da doença pode ter sido subestimada. Por último, recentes estudos têm avaliado a associação entre o IMC e a espessura da coróide. Yumusak *et al.* verificaram que a espessura da coróide aumenta em mulheres obesas, havendo uma correlação positiva entre estas duas variáveis ²⁵². Já Dogan *et al.* identificaram que os doentes com obesidade mórbida apresentavam valores de espessura da

coróide mais baixos ²⁵³. Desta forma, o IMC deve ser incluído em estudos futuros na tentativa de eliminar este fator de confundimento.

CAMADAS DA RETINA

Na primeira observação (visita V1) deste estudo longitudinal, a espessura das diferentes camadas da retina de indivíduos não diabéticos foi comparada com a de doentes diabéticos classificados de acordo com a duração da diabetes. De uma forma geral, a análise revelou uma diminuição significativa da espessura da camada de FR nos doentes diabéticos quando comparada com a dos não diabéticos.

Os fotorreceptores são os neurónios mais metabolicamente ativos do sistema nervoso central ²⁵⁴, com cerca de 75% do total de mitocôndrias da retina ^{255,256}. Contudo, geralmente nem sempre são considerados células com um papel fundamental na patogénese da RD, possivelmente devido à sua distância substancial nos microvasos retinianos que são precocemente afetados na RD. Existem, no entanto, vários estudos em animais que têm identificado degeneração dos FR na DM ^{83,257,258}. Para além destes estudos, resultados eletrofisiológicos também têm sugerido que os FR e/ou o EPR apresentam algum défice funcional na diabetes mesmo antes do desenvolvimento de RD ^{259,260}.

A vasculopatia da camada coriocapilar que nutre os fotorreceptores pode ser a causa da degeneração precoce destas células nos doentes diabéticos. A coroidopatia diabética em olhos diabéticos sem RD tem sido identificada em estudos histológicos, em animais e clínicos, sendo caracterizada pelas alterações do fluxo sanguíneo da coróide, défice na autorregulação ²⁶¹, diferenças na espessura da coróide medida pelo OCT ²¹⁴, alterações patológicas dos capilares similares a um processo degenerativo assim como *dropouts* capilares ²⁶². Desta forma, é possível que as alterações microvasculares da coróide possam contribuir para a degeneração e consequente diminuição da espessura da camada de FR descrita neste estudo. Outra causa possível para a perda dos FR pode ser o efeito direto da hiperglicemia e hipoinsulinemia. A DM provoca alterações na via de sinalização da insulina nos FR, originando defeitos na via da neuroprotecção dos mesmos ^{263,264}.

Um dos resultados mais interessantes deste estudo foi o padrão de menor espessura da camada de FR, não uniforme de acordo com a duração da diabetes. Doentes diabéticos com maior ou menor duração (grupo III e I, respetivamente) apresentaram os valores de espessura de FR mais baixos. Já nos doentes com duração moderada da doença (grupo II) verificaram-se valores ligeiramente superiores ao do grupo I e III. Esta observação pode ser explicada por um edema celular temporário devido a várias razões, desde a hipoxia induzida pela diabetes ²⁶⁵ ao stress oxidativo com aumento da produção de superóxido entre outras espécies reativas de oxigénio a nível da retina ²⁶⁶, as quais induzem a libertação de um conjunto de moléculas pró-

inflamatórias, como a sintetase do óxido nítrico e a molécula de adesão intercelular 1, e alterações a nível dos vasos retinianos e do espaço extravascular. Por fim, a este contínuo edema celular seguir-se-á possível atrofia ²⁶⁵ explicando, assim, a menor espessura da camada de FR encontrada no grupo de doentes diabéticos com DM há mais anos (grupo III). Este comportamento não linear é importante para poder explicar alguns resultados contraditórios de diferentes estudos nesta área, uma vez que cada um deles pode recrutar doentes com diferentes durações de diabetes. De referir, ainda, a importância da camada de FR no desenvolvimento da RD, uma vez que a sua perda inicial pode ser protetora, diminuindo a produção de espécies reativas de oxigénio e, dessa forma, a gravidade da degeneração vascular da RD ^{267,268}. No entanto, Arden *et al.* ^{269–271} observaram que os fotorreceptores, células com elevada atividade metabólica em condições escotópicas, em situações em que a vasculatura retiniana se encontra comprometida (como na diabetes), originarão um ambiente retiniano ainda mais hipóxico que o habitual.

A diabetes induz ainda um conjunto de alterações no fluxo iónico nos fotorreceptores. Sabemos que o influxo mantido de cálcio para os FR através dos canais de cálcio tipo L (CCTLs) é essencial para a libertação do neurotransmissor glutamato ²⁷². Um conjunto de estudos em animais tem identificado que estes canais se encontram encerrados em condições escotópicas na diabetes ²⁷². Várias hipóteses têm sido colocadas para esta inibição: (1) o defeito induzido pela diabetes na regulação dos canais iónicos dos FR é secundário a stress oxidativo ^{273,274}; (2) a diabetes altera a eficiência da cadeia de eletrões gerando superóxido e reduzindo a função mitocondrial que mantém os canais abertos ²⁷⁴; (3) a PKC suprime a atividade dos CCTLs ²⁷⁵. Assim, haverá um nível aumentado de glutamato nos FR. O glutamato é o neurotransmissor excitatório de maior importância da retina e tem um papel na neurotransmissão dos FR para as células bipolares e destas para as células ganglionares. Contudo, elevados níveis de glutamato são responsáveis pela chamada excitotoxicidade que, por sua vez, origina apoptose e neurodegeneração celular ⁸⁰. Diferentes estudos identificaram um aumento das concentrações de glutamato em modelos animais diabéticos e no vítreo de doentes diabéticos com RDP ^{86,276}. No entanto, não existe informação sobre os seus níveis em estadios precoces da RD. Mais estudos são necessários para interpretar estes resultados e para colocar a hipótese de que os fotorreceptores têm um papel fundamental no desenvolvimento precoce da RD.

Os diferentes estudos clínicos que utilizaram o SD-OCT para identificar alterações correspondentes ao processo neurodegenerativo precoce da RD, tipicamente analisaram as camadas internas da retina, revelando uma diminuição significativa da espessura das camadas CFNR e CCG em doentes diabéticos sem RD ^{277–279} ou não demonstrando diferenças em nenhuma

das camadas internas, comparando controlos não diabéticos com doentes diabéticos tipo 1 ou tipo 2 sem RD ^{280,281}. Vujosevic *et al.* estudou as camadas internas e externas da retina mas, contrariamente aos resultados obtidos neste projeto, não identificou alterações na espessura da camada EPR/FR. Contudo, estes autores estudaram estas camadas em conjunto, não as tendo analisado separadamente.

De referir, ainda, que as camadas mais internas e camada de EPR obtiveram valores superiores nos doentes diabéticos sem RD. No entanto, o significado estatístico desta superioridade só se manteve em determinados setores (setor T3 da CFNR, setor I3 do grupo II da CNI e setor T6 dos grupos I e II da camada do EPR). Este aumento pode corresponder ao início da diminuição da capacidade de autorregulação da retina com aumento da permeabilidade vascular e extravasamento de fluido intrarretiniano.

Este estudo longitudinal revelou que ao fim de um ano de seguimento dos doentes diabéticos sem RD, independentemente de terem ou não desenvolvido RD, e após terem sido efetuados ajustamentos considerando fatores de confundimento e correções para multiplicidade de testes, as camadas internas (CCG, setor I3 e N6; CPI, setor S6 e N6; e CNI, setor T6 e N6), o setor S6 da CPE e a RT (setor S3, I3, N3, S6 e T6) sofreram diminuição significativa na sua espessura.

Não se identificou uma associação significativa entre a presença de RD e esta diminuição das espessuras das diferentes camadas. No entanto, houve uma tendência consistente para uma diminuição da espessura da RT e dos FR, em todos os setores, após um ano de *follow-up* dos doentes diabéticos, sendo esta diminuição maior nos que desenvolveram RD. Estes doentes tiveram uma diminuição da espessura da RT de 13.04 a 16.63 μm nos setores centrais e do anel mais interno ($p = 0.004$ a 0.024) e de FR nos setores I3 e N6 de 0.408 e 0.592 μm , respetivamente ($p = 0.001$ e 0.022). Uma amostra de maior dimensão de doentes com RD seria necessária para confirmar os resultados obtidos nestas análises relativas à variável RD.

Elliott *et al.* estudaram e quantificaram a diminuição das espessuras das diferentes camadas internas da retina ao longo do tempo em 45 doentes diabéticos sem RD ou com RDNP ligeira. Reportaram, assim, uma diminuição progressiva da CFNR de 0.25 $\mu\text{m}/\text{ano}$ e da CCG/CPI de 0.29 $\mu\text{m}/\text{ano}$, durante um período de tempo de 4 anos, independentemente dos valores de HbA1c, da idade e/ou do género ²⁸². Esta é uma diminuição mais acelerada do que a que ocorre em indivíduos não diabéticos. Demirkaya *et al.* determinaram os efeitos da idade na espessura das camadas da retina usando o SD-OCT e estimaram que, para um período de 20 anos, um indivíduo saudável perde aproximadamente 2.06 μm na CCG pericentral, 0.92 μm na CPI periférica e 1.76

µm nos segmentos externos dos FR a nível foveal, enquanto a camada do EPR aumenta 1.32 µm²⁸³.

Tal como Barber *et al.* publicaram através dos seus estudos experimentais em animais e clínicos, a diabetes e a hiperglicemia crónica afetam toda a retina, que funciona como uma unidade neurovascular¹⁰², sendo as principais características de neurodegeneração da retina a apoptose neuronal e a ativação glial. Assim, não é surpreendente que ao fim de um ano de seguimento de doentes diabéticos sem RD, para além da diminuição da espessura da RT se verifique também uma diminuição das camadas internas da retina por perda das suas células ganglionares e das células da glia. A DM é responsável pela apoptose das células retinianas neurais através de vários mecanismos: (1) acumulação de neurofilamentos relacionada com o transporte axonal retrógrado nos axónios das células ganglionares da retina²⁸⁴; (2) aumento dos níveis de glutamato; e (3) aumento dos fatores neurotóxicos⁸⁰ e de espécies reativas de oxigénio na micróglia²⁸⁵.

Vários estudos têm demonstrado esta diminuição da retina interna em doentes diabéticos tipo 1²⁸¹ e tipo 2 sem RD^{223,279}, no entanto, não tem sido encontrada uma relação com a duração da doença e não existem, até ao momento, estudos longitudinais clínicos de grandes séries que avaliem estas alterações ao longo do tempo em doentes diabéticos sem RD.

Esta análise da retina teve algumas limitações. Em primeiro lugar, apesar de ser um dos maiores estudos nesta área – incluindo 125 doentes sem RD, ao subdividir esta amostra em grupos de acordo com a duração da doença, a capacidade de subavaliar as diferentes espessuras da retina pode ter sido dificultada. Ainda assim, a análise dos subgrupos de acordo com a duração da doença fornece uma nova base para futuros estudos. Em segundo lugar, a avaliação das espessuras da retina foi realizada com um *software* automático. No entanto, quando a segmentação automática apresentava erros de segmentação, uma correção manual foi realizada por um oftalmologista, desconhecedor do diagnóstico dos doentes. Em terceiro lugar, a duração da doença na DM tipo 2 pode ser novamente subestimada, limitação esta já referida na discussão do subtema coróide.

CAPÍTULO VI – CONCLUSÕES

O estudo efetuado ao longo de 1 ano em doentes diabéticos sem RD, utilizando o SD-OCT, permitiu obter as seguintes conclusões:

1. Doentes diabéticos sem RD quando comparados com indivíduos não diabéticos têm uma diminuição da espessura da camada de FR ($p < 0.0007$), sugerindo a presença de alterações neurodegenerativas antes do aparecimento de lesões microvasculares.
2. A diminuição da espessura da camada de FR nos doentes diabéticos não é linear com a duração da DM. Nos doentes com o diagnóstico de diabetes mais recente (< 5 anos), a espessura da camada de FR é menor do que naqueles com duração da doença moderada (diagnóstico entre 5 a 10 anos). Interessantemente, os doentes com diabetes há mais anos (> 10 anos) apresentam os valores de espessura de FR menores.
3. Na primeira observação nenhuma das outras camadas da retina revela diferenças significativas exceto em localizações pontuais onde se verifica um aumento da espessura face aos indivíduos não diabéticos (setor T3 da CFNR, setor I3 do grupo II da CNI e setor T6 dos grupos I e II da camada do EPR). Este aumento pode corresponder ao início da falência da capacidade de autorregulação da retina com aumento da permeabilidade vascular e extravasamento de fluido intrarretiniano.
4. Após um ano de seguimento, os doentes diabéticos sem RD, independentemente de terem ou não desenvolvido RD, apresentam alteração das células ganglionares da retina assim como da sua microglia, identificada pela diminuição das camadas internas (CCG, setor I3 e N6; CPI, setor S6 e N6; e CNI, setor T6 e N6); setor S6 da CPE e da espessura da RT (setor S3, I3, N3, S6 e T6).
5. Identificou-se uma associação negativa entre o desenvolvimento de RD e a espessura da RT nos setores centrais e nos setores do anel mais interno, ($p = 0.004$ a 0.024), assim como com a camada de FR nos setores I3 e N6, ($p = 0.001$ e 0.022). A espessura da RT diminui, em média, entre 13.04 e $16.63 \mu\text{m}$, e a camada de FR entre 0.408 e $0.592 \mu\text{m}$, nos setores referidos.

6. Nos doentes diabéticos sem RD verificou-se uma tendência para um aumento, em média, da espessura da coróide em todas as localizações (entre 6.16 e 24.27 μm) comparativamente com os indivíduos não diabéticos, embora sem significado estatístico. A espessura da coróide associou-se, ainda, de forma positiva com a APO somente no grupo de doentes diabéticos com um aumento, em média, entre 8.5 e 11.6 μm por cada mmHg de aumento da APO. Um comportamento diferente entre ambos os grupos pode corresponder a uma coroidopatia diabética precoce antes do aparecimento da RD clinicamente visível.
7. Nos doentes diabéticos sem RD, a espessura da coróide parece estabilizar após 150 meses de duração da doença, e não revela flutuação com a HbA1c e com a PAM. Estas alterações são sugestivas do aumento do índice de resistência do tecido coróide dos doentes diabéticos relativamente ao dos não diabéticos.
8. Após um ano de seguimento dos doentes diabéticos, a espessura da coróide aumentou face à primeira observação entre 10.01 e 17.34 μm ($p < 0.001$ a 0.003). Apesar de não haver significado estatístico quando comparamos os resultados dos doentes com e sem RD, observamos que o aumento da espessura da coróide é maior naqueles que não desenvolveram RD (230.28 a 280.10 μm *versus* 217.00 a 269.56 μm).
9. SD-OCT é um método não-invasivo que permite a identificação de alterações estruturais precoces de RD enquanto doença neurodegenerativa, antes da sua identificação através da observação fundoscópica de lesões microvasculares.

CAPÍTULO VII – PERSPETIVAS FUTURAS

Nos últimos 20 anos, o conceito de que a neurodegeneração tem um papel no desenvolvimento da RD tem sido largamente aceite. A hipótese de a morte neuronal ser a característica principal deste processo de neurodegeneração e a responsável pela perda visual nos doentes diabéticos sem RD clinicamente visível, é uma abordagem muito simplista desta doença que envolve mecanismos fisiopatológicos complexos. Evidências recentes sugerem que outros processos podem contribuir para a redução da função neuronal e perda visual mesmo antes da apoptose celular.

O presente estudo contribuiu para a compreensão da neurodegeneração precoce da RD através da identificação de uma diminuição significativa da camada de FR nos doentes diabéticos sem RD, que está associada a uma tendência do aumento da espessura da coróide. Interessantemente, esta diminuição da camada de FR não se verificou linear com a duração da doença, quando subdividido o grupo de doentes diabéticos em três grupos, de acordo com a duração da diabetes. Os doentes com o diagnóstico de diabetes há entre 5 a 10 anos tiveram valores de espessura da camada de FR maiores que aqueles que têm diabetes há menos de 5 anos ou há mais de 10 anos, sendo este último grupo, com maior duração da doença, o que apresentou valores menores de FR. Esta diferença relativamente ao grupo com duração de doença moderada pode explicar os resultados contraditórios dos diferentes estudos publicados.

Também a observação dos doentes diabéticos ao fim de um ano, permitiu a identificação de alteração nas camadas mais internas da retina, independentemente do desenvolvimento de RD, assim como a continuação da tendência para o aumento da espessura da coróide. Foi verificado ainda que nos doentes que desenvolveram RD, a coróide apresenta menor espessura relativamente aos que não desenvolveram RD, e a camada de FR e espessura de RT é significativamente menor.

Desta forma, vários estudos futuros serão necessários para confirmar e complementar estas conclusões, sendo este um projeto promissor de uma investigação de continuidade.

1. Sendo a camada de FR a que precocemente está afetada em doentes diabéticos sem sinais clinicamente visíveis de RD, será relevante identificar valores preditivos de espessura desta camada que nos identifiquem os doentes diabéticos que se encontram

em risco de desenvolver RD. Através destes pontos de corte, o OCT poderá ser uma ferramenta não-invasiva, útil mesmo nos doentes sem sinais fundoscópicos de RD.

2. Aumentar a amostra dos subgrupos de doentes diabéticos sem RD para explicar o comportamento não linear da camada de FR com a duração da doença, de forma a sistematizar e compreender melhor os resultados contraditórios identificados nos diferentes estudos publicados.
3. O acompanhamento destes doentes diabéticos por um maior intervalo de tempo, ajudar-nos-á a perceber as alterações que já foram identificadas nas camadas mais internas da retina após apenas um ano de *follow-up*.
4. Criar um grupo de doentes diabéticos com RDNP sem edema macular de forma a comparar as suas alterações com as de doentes diabéticos sem RD, com o objetivo de identificar uma relação temporal relativamente às diferenças identificadas.
5. Estimular novos estudos básicos para identificar variáveis biológicas que possam explicar a flutuação verificada nas diferentes espessuras da retina e coróide ao longo do tempo nos doentes diabéticos sem RD.
6. Promover estudos farmacológicos básicos com base nestas características de neurodegeneração. Apoiar novas opções terapêuticas ou complementar a investigação de neuroprotetores já em estudo: antagonistas do glutamato, agentes anti-inflamatórios, brimonidina, somatostatina, peptídio do fator derivado do epitélio pigmentado, fator de crescimento neurotrófico, hidrogéis de insulina subconjuntivais, entre outros. Os estudos que permitem a compreensão dos mecanismos que originam a neurodegeneração e a identificação dos mediadores entre a neurodegeneração e a microangiopatia são essenciais para novas estratégias terapêuticas. O OCT e a

identificação das diferentes camadas precocemente afetadas podem complementar estes ensaios.

Todos os estudos que têm fomentado o novo paradigma da RD enquanto doença neurodegenerativa irão suportar a revisão da Classificação Clínica Internacional de forma a incluir uma nova fase de RD, antes do aparecimento de alterações microvasculares identificáveis clinicamente.

Este estudo permitiu a criação de uma base de dados considerável em que, através da interdisciplinaridade de diferentes áreas e de departamentos nacionais e internacionais, se criaram novas linhas de investigação.

Para mim, este é, sem dúvida, o início de uma investigação que servirá de base a um conjunto de novos estudos/projetos com diferentes equipas nacionais e internacionais na área da Diabetes Mellitus, considerada uma pandemia do século XXI. Para além disso, e não menos importante, é o crescimento enquanto clínica que este projeto permitiu. Cada vez mais o Médico deve basear a sua prática nos conhecimentos científicos e colocar novas questões que poderão conduzir ao avanço da ciência em prol de cada doente que observa.

BIBLIOGRAFIA

1. Kalantzis G, Angelou M, Poulakou-Rebelakou E. Diabetic retinopathy: an historical assessment. *Hormones (Athens)*. 2006;5(1):72-75.
2. diabète. Vocabolario Treccani. <http://www.treccani.it/vocabolario/diabete/>. Accessed May 3, 2016.
3. mellito. Vocabolario Treccani. <http://www.treccani.it/vocabolario/tag/mellito/>. Accessed May 3, 2016.
4. Diabetes DOF. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2009;32(SUPPL. 1).
5. International Diabetes Federation (IDF). IDF Diabetes Atlas 7th edition. *idf.org*. 2015.
6. Correia LG, Boavida JM, De Almeida JPF, et al. *Diabetes, Factos E Numeros Portugal, Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes, Edição 2015*.
7. Gardete-Correia L, Boavida JM, Raposo JF, et al. First diabetes prevalence study in Portugal: PREVADIAB study. *Diabet Med*. 2010;27(8):879-881.
8. DGS. Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus. *Norma da Direção Geral da Saúde*. 2011:1-13.
9. WHO. WHO | Use of glycated haemoglobin (HbA1c) in the diagnosis of diabetes mellitus. *Abbreviated Rep a WHO Consult*. 2011:1-25.
10. Kerner W, Brückel J. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2014;122(7):384-386.
11. Fong DS, Aiello LP, Ferris FL, Klein R. Diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 2004;27(10):2540-2553.
12. Gross JL, De Azevedo MJ, Silveiro SP, Canani LH, Caramori ML, Zelmanovitz T. Diabetic nephropathy: Diagnosis, prevention, and treatment. *Diabetes Care*. 2005;28(1):164-176.
13. Adler AI, Stevens RJ, Manley SE, Bilous RW, Cull CA, Holman RR. Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: The United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64). *Kidney Int*. 2003;63(1):225-232.
14. Chaturvedi N, Bandinelli S, Mangili R, Penno G, Rottiers RE, Fuller JH. Microalbuminuria in type 1 diabetes: Rates, risk factors and glycemic threshold. *Kidney Int*. 2001;60(1):219-227.
15. ADA. Standards of medical care in diabetes--2014. *Diabetes Care*. 2014;37 Suppl 1(October 2013):S14-80.
16. Boulton AJ, Vinik AL, Arezzo JC, et al. Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2005;28(4):956-962.

17. Laing SP, Swerdlow AJ, Slater SD, *et al.* Mortality from heart disease in a cohort of 23,000 patients with insulin-treated diabetes. *Diabetologia*. 2003;46(6):760-765.
18. Paterson AD, Rutledge BN, Cleary PA, Lachin JM, Crow RS. The effect of intensive diabetes treatment on resting heart rate in type 1 diabetes: The diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study. *Diabetes Care*. 2007;30(8):2107-2112.
19. Hogan P, Dall T, Nikolov P. Economic costs of diabetes in the U. S 2002 *Diabetes Care*. 2003;26(3):917-932.
20. Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. *JAMA*. 1979;241(19):2035-2038.
21. Almdal T, Almdal T, Scharling H, *et al.* The independent effect of type 2 diabetes mellitus on ischemic heart disease, stroke, and death: a population-based study of 13,000 men and women with 20 years of follow-up. *Arch Intern Med*. 2004;164(13):1422-1426.
22. Avogaro A, Giorda C, Maggini M, *et al.* Incidence of Coronary Heart Disease in Type 2 Diabetic Men and Women: Impact of microvascular complications, treatment, and geographic location. *Diabetes Care*. 2007;30(5):1241-1247.
23. Lehto S, Rönnemaa T, Pyörälä K, Laakso M. Predictors of stroke in middle-aged patients with non-insulin-dependent diabetes. *Stroke*. 1996;27(1):63-68.
24. Nathan DM, Cleary PA, Backlund J-YC, *et al.* Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med*. 2005;353(25):2643-2653.
25. Detection H, Program F. Efficacy of atenolol and captopril in reducing risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 39. UK Prospective Diabetes Study Group. *BMJ*. 1998;317(7160):713-720.
26. Turner R, Holman R, Stratton I, *et al.* Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. UK Prospective Diabetes Study Group. *BMJ*. 1998;317(7160):703-713.
27. Kempen JH, O'Colmain BJ, Leske MC, *et al.* The prevalence of diabetic retinopathy among adults in the United States. *Arch Ophthalmol*. 2004;122(4):552-563.
28. Yau JWY, Rogers SL, Kawasaki R, *et al.* Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 2012;35(3):556-564.
29. Dutra Medeiros M, Mesquita E, Papoila AL, Genro V, Raposo JF. First diabetic retinopathy prevalence study in Portugal: RETINODIAB Study--Evaluation of the screening programme for Lisbon and Tagus Valley region. *Br J Ophthalmol*. 2015;99:1328-1333.
30. Massin P, Erginay A, Ben Mehidi A, *et al.* Evaluation of a new non-mydratic digital camera

- for detection of diabetic retinopathy. *Diabet Med.* 2003;20(8):635-641.
31. Williams R, Airey M, Baxter H, Forrester J, Kennedy-Martin T, Girach A. Epidemiology of diabetic retinopathy and macular oedema: a systematic review. *Eye (Lond).* 2004;18(10):963-983.
 32. Sivaprasad S, Gupta B, Crosby-Nwaobi R, Evans J. Prevalence of Diabetic Retinopathy in Various Ethnic Groups: A Worldwide Perspective. *Surv Ophthalmol.* 2012;57(4):347-370.
 33. Looker HC, Nyangoma SO, Cromie D, *et al.* Diabetic retinopathy at diagnosis of type 2 diabetes in Scotland. *Diabetologia.* 2012;55(9):2335-2342.
 34. Thomas RL, Dunstan FD, Luzio SD, *et al.* Prevalence of diabetic retinopathy within a national diabetic retinopathy screening service. *Br J Ophthalmol.* 2015;99(1):64-68.
 35. Dutra Medeiros M, Mesquita E, Gardete-Correia L, *et al.* First incidence and progression study for diabetic retinopathy in Portugal, the RETINODIAB study: Evaluation of the screening program for Lisbon region. *Ophthalmology.* 2015;122(12):2473-2481.
 36. Klein R, Knudtson MD, Lee KE, Gangnon R, Klein BEK. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy XXII. The Twenty-Five-Year Progression of Retinopathy in Persons with Type 1 Diabetes. *Ophthalmology.* 2008;115(11):1859-1868.
 37. Younis N, Broadbent DM, Vora JP, Harding SP. Incidence of sight-threatening retinopathy in patients with type 2 diabetes in the Liverpool Diabetic Eye Study: A cohort study. *Lancet.* 2003;361(9353):195-200.
 38. Thomas RL, Dunstan F, Luzio SD, *et al.* Incidence of diabetic retinopathy in people with type 2 diabetes mellitus attending the Diabetic Retinopathy Screening Service for Wales: retrospective analysis. *BMJ.* 2012;344(February):e874.
 39. Bhagat N, Grigorian RA, Tutela A, Zarbin MA. Diabetic macular edema: pathogenesis and treatment. *Surv Ophthalmol.* 54(1):1-32.
 40. Bandello F, Lattanzio R, Zucchiatti I, Del Turco C. Pathophysiology and treatment of diabetic retinopathy. *Acta Diabetol.* 2013;50(1):1-20.
 41. Cunha-Vaz J, Faria de Abreu JR, Campos AJ. Early breakdown of the blood-retinal barrier in diabetes. *Br J Ophthalmol.* 1975;59(11):649-656.
 42. Tarr JM, Kaul K, Chopra M, Kohner EM, Chibber R. Pathophysiology of Diabetic Retinopathy. *ISRN Ophthalmol.* 2013;2013:1-13.
 43. Goh S-Y, Cooper ME. Clinical review: The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(4):1143-1152.
 44. Pinach S, Burt D, Berrone E, *et al.* Retinal heat shock protein 25 in early experimental diabetes. *Acta Diabetol.* 2013;50(4):579-585.

45. Ghanem AA, Elewa A, Arafa LF. Pentosidine and N-carboxymethyl-lysine: biomarkers for type 2 diabetic retinopathy. *Eur J Ophthalmol*. 21(1):48-54.
46. Zong H, Ward M, Stitt AW. AGEs, RAGE, and diabetic retinopathy. *Curr Diab Rep*. 2011;11(4):244-252.
47. Chung SSM, Chung SK. Aldose reductase in diabetic microvascular complications. *Curr Drug Targets*. 2005;6(4):475-486.
48. Lorenzi M. The polyol pathway as a mechanism for diabetic retinopathy: attractive, elusive, and resilient. *Exp Diabetes Res*. 2007;2007:61038.
49. Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*. 1998;47(6):859-866.
50. Aiello LP, Bursell SE, Clermont A, *et al*. Vascular endothelial growth factor-induced retinal permeability is mediated by protein kinase C in vivo and suppressed by an orally effective beta-isoform-selective inhibitor. *Diabetes*. 1997;46(9):1473-1480.
51. Aiello LP, Clermont A, Arora V, Davis MD, Sheetz MJ, Bursell S-E. Inhibition of PKC beta by oral administration of ruboxistaurin is well tolerated and ameliorates diabetes-induced retinal hemodynamic abnormalities in patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(1):86-92.
52. Wilkinson-Berka JL. Angiotensin and diabetic retinopathy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38(5-6):752-765.
53. Funatsu H, Yamashita H, Nakanishi Y, Hori S. Angiotensin II and vascular endothelial growth factor in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol*. 2002;86(3):311-315.
54. Otani A, Takagi H, Suzuma K, Honda Y. Angiotensin II potentiates vascular endothelial growth factor-induced angiogenic activity in retinal microcapillary endothelial cells. *Circ Res*. 1998;82(5):619-628.
55. Hueber A, Wiedemann P, Esser P, Heimann K. Basic fibroblast growth factor mRNA, bFGF peptide and FGF receptor in epiretinal membranes of intraocular proliferative disorders (PVR and PDR). *Int Ophthalmol*. 20(6):345-350.
56. Haurigot V, Villacampa P, Ribera A, *et al*. Increased intraocular insulin-like growth factor-I triggers blood-retinal barrier breakdown. *J Biol Chem*. 2009;284(34):22961-22969.
57. Wilkinson-Berka JL, Wraight C, Werther G. The role of growth hormone, insulin-like growth factor and somatostatin in diabetic retinopathy. *Curr Med Chem*. 2006;13(27):3307-3317.
58. Rangasamy S, Srinivasan R, Maestas J, McGuire PG, Das A. A potential role for angiopoietin 2 in the regulation of the blood-retinal barrier in diabetic retinopathy. *Invest*

- Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(6):3784-3791.
59. Patel JI, Hykin PG, Gregor ZJ, Boulton M, Cree IA. Angiopoietin concentrations in diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol.* 2005;89(4):480-483.
 60. Coxon A, Bready J, Min H, *et al.* Context-dependent role of angiopoietin-1 inhibition in the suppression of angiogenesis and tumor growth: implications for AMG 386, an angiopoietin-1/2-neutralizing peptibody. *Mol Cancer Ther.* 2010;9(10):2641-2651.
 61. Brooks HL, Caballero S, Newell CK, *et al.* Vitreous levels of vascular endothelial growth factor and stromal-derived factor 1 in patients with diabetic retinopathy and cystoid macular edema before and after intraocular injection of triamcinolone. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960).* 2004;122(12):1801-1807.
 62. Lev-Ran A, Hwang DL, Miller JD, Josefsberg Z. Excretion of epidermal growth factor (EGF) in diabetes. *Clin Chim Acta.* 1990;192(3):201-206.
 63. Min SH, Lee T-I, Chung YS, Kim HK. Transforming growth factor-beta levels in human aqueous humor of glaucomatous, diabetic and uveitic eyes. *Korean J Ophthalmol.* 2006;20(3):162-165.
 64. Praidou A, Klangas I, Papakonstantinou E, *et al.* Vitreous and serum levels of platelet-derived growth factor and their correlation in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Curr Eye Res.* 2009;34(2):152-161.
 65. Simó R, Hernández C. Intravitreal anti-VEGF for diabetic retinopathy: hopes and fears for a new therapeutic strategy. *Diabetologia.* 2008;51(9):1574-1580.
 66. Eckardt K-U. Erythropoietin and microvascular diabetic complications. *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24(2):388-390.
 67. Ishida S, Usui T, Yamashiro K, *et al.* VEGF164 is proinflammatory in the diabetic retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(5):2155-2162.
 68. Comer GM, Ciulla TA. Pharmacotherapy for diabetic retinopathy. *Curr Opin Ophthalmol.* 2004;15(6):508-518.
 69. Ruberte J, Ayuso E, Navarro M, *et al.* Increased ocular levels of IGF-1 in transgenic mice lead to diabetes-like eye disease. *J Clin Invest.* 2004;113(8):1149-1157.
 70. Joussen AM, Poulaki V, Qin W, *et al.* Retinal vascular endothelial growth factor induces intercellular adhesion molecule-1 and endothelial nitric oxide synthase expression and initiates early diabetic retinal leukocyte adhesion in vivo. *Am J Pathol.* 2002;160(2):501-509.
 71. Madsen-Bouterse SA, Kowluru RA. Oxidative stress and diabetic retinopathy: pathophysiological mechanisms and treatment perspectives. *Rev Endocr Metab Disord.* 2008;9(4):315-327.

72. van Hecke M V, Dekker JM, Nijpels G, *et al.* Inflammation and endothelial dysfunction are associated with retinopathy: the Hoorn Study. *Diabetologia*. 2005;48(7):1300-1306.
73. Spijkerman AMW, Gall M-A, Tarnow L, *et al.* Endothelial dysfunction and low-grade inflammation and the progression of retinopathy in Type 2 diabetes. *Diabet Med*. 2007;24(9):969-976.
74. Klein BEK, Knudtson MD, Tsai MY, Klein R. The relation of markers of inflammation and endothelial dysfunction to the prevalence and progression of diabetic retinopathy: Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960)*. 2009;127(9):1175-1182.
75. Riva CE, Logean E, Falsini B. Visually evoked hemodynamical response and assessment of neurovascular coupling in the optic nerve and retina. *Prog Retin Eye Res*. 2005;24(2):183-215.
76. Falsini B, Riva CE, Logean E. Flicker-evoked changes in human optic nerve blood flow: Relationship with retinal neural activity. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43(7):2309-2316.
77. Buerk DG, Riva CE, Cranstoun SD. Frequency and luminance-dependent blood flow and K⁺ ion changes during flicker stimuli in cat optic nerve head. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 1995;36(11):2216-2227.
78. Kern TS. Interrelationships between the retinal neuroglia and vasculature in diabetes. *Diabetes Metab J*. 2014;38(3):163-170..
79. Barber AJ, Gardner TW, Abcouwer SF. The significance of vascular and neural apoptosis to the pathology of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(2):1156-1163.
80. Villarroel M, Ciudin A, Hernández C, Simó R. Neurodegeneration: An early event of diabetic retinopathy. *World J Diabetes*. 2010;1(2):57-64.
81. Gardner TW, Antonetti DA, Barber AJ, LaNoue KF, Levison SW. Diabetic retinopathy: more than meets the eye. *Surv Ophthalmol*. 2002;47 Suppl 2:S253-62.
82. Lieth E, Gardner TW, Barber AJ, Antonetti DA, Penn State Retina Research Group. Retinal neurodegeneration: early pathology in diabetes. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2000;28(1):3-8.
83. Park S-H, Park J-W, Park S-J, *et al.* Apoptotic death of photoreceptors in the streptozotocin-induced diabetic rat retina. *Diabetologia*. 2003;46(9):1260-1268.
84. Lieth E, LaNoue KF, Antonetti DA, Ratz M. Diabetes Reduces Glutamate Oxidation and Glutamine Synthesis in the Retina. *Exp Eye Res*. 2000;70(6):723-730.
85. Kowluru RA, Engerman RL, Case GL, Kern TS. Retinal glutamate in diabetes and effect of

- antioxidants. *Neurochem Int.* 2001;38(5):385-390.
86. Ambati J, Chalam K, Chawla D, *et al.* Elevated gamma-aminobutyric acid, glutamate, and vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol.* 1997;115(9):1161-1166.
 87. Santiago AR, Gaspar JM, Baptista FI, *et al.* Diabetes changes the levels of ionotropic glutamate receptors in the rat retina. *Mol Vis.* 2009;15(December 2008):1620-1630.
 88. Jaeger E. Beiträge zur Pathologie des Auges. *Wien.* 1856.
 89. Hirschberg J. Über diabetische Netzhautentzündung. *Deutsch Med Wschr.* 1890;16:1181.
 90. Ballantyne AJ LA. The pathology of diabetic retinopathy. *Trans Ophthalmol Soc UK.* 1943;(63):95.
 91. Ashton N. Vascular changes in diabetes with particular reference to the retinal vessels; preliminary report. *Br J Ophthalmol.* 1949;33(7):407-420.
 92. Cogan DG, Toussaint D, Kuwabara T. Retinal vascular patterns. IV. Diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960).* 1961;66:366-378.
 93. Goldber, M.F., Jampol LM. Knowledge of diabetic retinopathy before 18 years after the Airlie House Symposium on Treatment of Diabetic Retinopathy. *Ophthalmol* 94. 1987:741-746.
 94. Diabetic retinopathy study. Report Number 6. Design, methods, and baseline results. Report Number 7. A modification of the Airlie House classification of diabetic retinopathy. Prepared by the Diabetic Retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1981;21(1 Pt 2):1-226.
 95. Grading diabetic retinopathy from stereoscopic color fundus photographs--an extension of the modified Airlie House classification. ETDRS report number 10. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. *Ophthalmology.* 1991;98(5 Suppl):786-806.
 96. Classification of diabetic retinopathy from fluorescein angiograms. ETDRS report number 11. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. *Ophthalmology.* 1991;98(5 Suppl):807-822.
 97. Bresnick GH. Diabetic macular edema. A review. *Ophthalmology.* 1986;93(7):989-997.
 98. Vujosevic S, Varano M, Egan C, *et al.* Relevance of Retinal Thickness Changes in the OCT Inner and Outer Rings to Predict Progression to Clinical Macular Edema: An Attempt of Composite Grading of Macular Edema. *Ophthalmic Res.* 2016;55(1):19-25.
 99. Wilkinson CP, Ferris FL, Klein RE, *et al.* Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. *Ophthalmology.* 2003;110(9):1677-1682.
 100. Klein R, Klein BEK, Moss SE, *et al.* The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic

- Retinopathy. *Arch Ophthalmol*. 1989;107(2):244.
101. Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD, DeMets DL. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. II. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960)*. 1984;102(4):520-526.
 102. Barber AJ, Lieth E, Khin SA, Antonetti DA, Buchanan AG, Gardner TW. Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin. *J Clin Invest*. 1998;102(4):783-791.
 103. GER. Retinopatía diabética Guidelines. *SPO*. 2009.
 104. Varma R, Torres M, Peña F, Klein R, Azen SP. Prevalence of diabetic retinopathy in adult Latinos: The Los Angeles Latino eye study. *Ophthalmology*. 2004;111(7):1298-1306.
 105. Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD, DeMets DL. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. III. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is 30 or more years. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960)*. 1984;102(4):527-532.
 106. Younis N, Broadbent DM, Harding SP, Vora JP. Prevalence of diabetic eye disease in patients entering a systematic primary care-based eye screening programme. *Diabet Med*. 2002;19(12):1014-1021.
 107. Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) Research Group, Lachin JM, White NH, et al. Effect of intensive diabetes therapy on the progression of diabetic retinopathy in patients with type 1 diabetes: 18 years of follow-up in the DCCT/EDIC. *Diabetes*. 2015;64(2):631-642.
 108. Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. Retinopathy and nephropathy in patients with type 1 diabetes four years after a trial of intensive therapy. *N Engl J Med*. 2000;342(6):381-389.
 109. Writing Team for the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. Effect of intensive therapy on the microvascular complications of type 1 diabetes mellitus. *JAMA*. 2002;287(19):2563-2569.
 110. The relationship of glycemic exposure (HbA1c) to the risk of development and progression of retinopathy in the diabetes control and complications trial. *Diabetes*. 1995;44(8):968-983.
 111. Progression of retinopathy with intensive versus conventional treatment in the Diabetes Control and Complications Trial. Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *Ophthalmology*. 1995;102(4):647-661.
 112. Wong TY, Liew G, Tapp RJ, et al. Relation between fasting glucose and retinopathy for diagnosis of diabetes: three population-based cross-sectional studies. *Lancet (London, England)*. 2008;371(9614):736-743.

113. Kohner EM, Stratton IM, Aldington SJ, Holman RR, Matthews DR, UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Relationship between the severity of retinopathy and progression to photocoagulation in patients with Type 2 diabetes mellitus in the UKPDS (UKPDS 52). *Diabet Med*. 2001;18(3):178-184.
114. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet (London, England)*. 1998;352(9131):837-853.
115. Klein R, Klein BE, Moss SE, Cruickshanks KJ. The Wisconsin Epidemiologic Study of diabetic retinopathy. XIV. Ten-year incidence and progression of diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960)*. 1994;112(9):1217-1228.
116. Klein R, Klein BE, Moss SE, Cruickshanks KJ. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy: XVII. The 14-year incidence and progression of diabetic retinopathy and associated risk factors in type 1 diabetes. *Ophthalmology*. 1998;105(10):1801-1815.
117. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med*. 1993;329(14):977-986.
118. Davis MD. Worsening of diabetic retinopathy after improvement of glycemic control. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960)*. 1998;116(7):931-932.
119. White NH, Sun W, Cleary PA, *et al*. Effect of prior intensive therapy in type 1 diabetes on 10-year progression of retinopathy in the DCCT/EDIC: comparison of adults and adolescents. *Diabetes*. 2010;59(5):1244-1253.
120. White NH, Sun W, Cleary PA, *et al*. Prolonged effect of intensive therapy on the risk of retinopathy complications in patients with type 1 diabetes mellitus: 10 years after the Diabetes Control and Complications Trial. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960)*. 2008;126(12):1707-1715.
121. Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC). Design, implementation, and preliminary results of a long-term follow-up of the Diabetes Control and Complications Trial cohort. *Diabetes Care*. 1999;22(1):99-111.
122. Stratton IM, Adler AI, Neil HA, *et al*. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ*. 2000;321(7258):405-412.
123. Stratton IM, Kohner EM, Aldington SJ, *et al*. UKPDS 50: risk factors for incidence and progression of retinopathy in Type II diabetes over 6 years from diagnosis. *Diabetologia*.

- 2001;44(2):156-163.
124. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. UK Prospective Diabetes Study Group. *BMJ*. 1998;317(7160):703-713.
 125. Chew EY, Klein ML, Ferris FL, *et al*. Association of elevated serum lipid levels with retinal hard exudate in diabetic retinopathy. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) Report 22. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960)*. 1996;114(9):1079-1084.
 126. Gordon B, Chang S, Kavanagh M, *et al*. The effects of lipid lowering on diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol*. 1991;112(4):385-391.
 127. Davis MD, Fisher MR, Gangnon RE, *et al*. Risk factors for high-risk proliferative diabetic retinopathy and severe visual loss: Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Report #18. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39(2):233-252.
 128. Matthews DR, Stratton IM, Aldington SJ, Holman RR, Kohner EM, UK Prospective Diabetes Study Group. Risks of progression of retinopathy and vision loss related to tight blood pressure control in type 2 diabetes mellitus: UKPDS 69. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960)*. 2004;122(11):1631-1640.
 129. Klein R, Klein BE, Moss SE. Is obesity related to microvascular and macrovascular complications in diabetes? The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. *Arch Intern Med*. 1997;157(6):650-656.
 130. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet (London, England)*. 1998;352(9131):854-865.
 131. Boelter MC, Gross JL, Canani LH, *et al*. Proliferative diabetic retinopathy is associated with microalbuminuria in patients with type 2 diabetes. *Brazilian J Med Biol Res = Rev Bras Pesqui médicas e biológicas / Soc Bras Biofísica* . [et al]. 2006;39(8):1033-1039.
 132. Friedman EA, Brown CD, Berman DH. Erythropoietin in diabetic macular edema and renal insufficiency. *Am J Kidney Dis*. 1995;26(1):202-208.
 133. Berman DH, Friedman EA. Partial absorption of hard exudates in patients with diabetic end-stage renal disease and severe anemia after treatment with erythropoietin. *Retina*. 1994;14(1):1-5.
 134. Donaldson M, Dodson PM. Medical treatment of diabetic retinopathy. *Eye (Lond)*. 2003;17(5):550-562. doi:10.1038/sj.eye.6700586.
 135. Effects of aspirin treatment on diabetic retinopathy. ETDRS report number 8. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. *Ophthalmology*. 1991;98(5 Suppl):757-765.

136. Oshitari T, Asaumi N, Watanabe M, Kumagai K, Mitamura Y. Severe macular edema induced by pioglitazone in a patient with diabetic retinopathy: a case study. *Vasc Health Risk Manag.* 2008;4(5):1137-1140.
137. Colucciello M. Vision loss due to macular edema induced by rosiglitazone treatment of diabetes mellitus. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960).* 2005;123(9):1273-1275.
138. DCCT. Effect of pregnancy on microvascular complications in the diabetes control and complications trial. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *Diabetes Care.* 2000;23(8):1084-1091.
139. Emptage NP, Kealey S, Lum FC, Garratt S. Preferred Practice Pattern: Diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol.* 2014;Updated Ja:<http://www.aao.org/preferred-practice-pattern/diab>.
140. Benson WE, Tasman W DT. *Diabetes Mellitus and the Eye. Duane's Clinical Ophthalmology.*; 1994.
141. Midena E, Vujosevic S. 6 Visual Psychophysics in Diabetic Retinopathy. *Ophthalmol Res Vis Dysfunct Diabetes Ed.*
142. Midena E, Segato T, Giuliano M, Zucchetto M. Macular recovery function (nyctometry) in diabetics without and with early retinopathy. *Br J Ophthalmol.* 1990;74(2):106-108.
143. St Vincent Declaration, 1989 _ WHO Euro and IDF Europe.pdf.
144. George Bakris M, Lawrence Blonde, MD F, Andrew J.M. Boulton M, et al. January Supplement Combined_Final Diabeets Care. *J Clin Appl Res Educ.* 2015;38(January):99.
145. DSCS/CCPNSV - Direção-Geral da Saúde. Boas Práticas em Oftalmologia - Elementos Clínicos de Avaliação e Referenciação. 2008:1-83.
146. Fundus photographic risk factors for progression of diabetic retinopathy. ETDRS report number 12. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. *Ophthalmology.* 1991;98(5 Suppl):823-833.
147. SPO. Orientações Clínicas - Retinopatia Diabética. *Suplemento.* 2015.
148. Smith AF. The economic impact of ophthalmic services for persons with diabetes in the Canadian Province of Nova Scotia: 1993-1996. *Ophthalmic Epidemiol.* 2001;8(1):13-25.
149. James M, Turner DA, Broadbent DM, Vora J, Harding SP. Cost effectiveness analysis of screening for sight threatening diabetic eye disease. *BMJ.* 2000;320(7250):1627-1631.
150. Cristina D, Marques S. Avaliação de Efetividade / Utilidade do Rastreio Sistemático versus Rastreio Ocasional da Retinopatia Diabética : Caso Português. 2013.
151. Muqit MMK, Marcellino GR, Henson DB, et al. Single-session vs multiple-session pattern scanning laser panretinal photocoagulation in proliferative diabetic retinopathy: The Manchester Pascal Study. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960).* 2010;128(5):525-533.

152. Muqit MMK, Marcellino GR, Henson DB, *et al.* Optos-guided pattern scan laser (Pascal)-targeted retinal photocoagulation in proliferative diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol.* 2013;91(3):251-258.
153. Huang D, Swanson EA, Lin CP, *et al.* Optical coherence tomography. *Science* (80-). 1991;254(5035):1178-1181.
154. O'SULLIVAN M. *Low Power Optical Thickness Measurements Using Low Coherence.* (NUI, 2000 Department of Physics U, ed.); 2000.
155. HARIHARAN P. *Basics of Interferometry.* (Elsevier Science, ed.); 2010.
156. Mitchell P, Bandello F, Schmidt-Erfurth U, *et al.* The RESTORE study: Ranibizumab monotherapy or combined with laser versus laser monotherapy for diabetic macular edema. *Ophthalmology.* 2011;118(4):615-625.
157. Massin P, Bandello F, Garweg J, Hansen L, Harding S. Safety and Efficacy of Ranibizumab in Diabetic Macular Edema (RESOLVE Study *). *Diabetes Care.* 2010;33(11):2399-2405.
158. Nguyen Q, Brown D, Marcus D, *et al.* Ranibizumab for diabetic macular edema: results from 2 phase III randomized trials: RISE and RIDE. *Ophthalmol* 2012 Apr;119(4)789-801. 2012;119(4):789-801.
159. Nguyen QD, Shah SM, Khwaja AA, *et al.* Two-Year Outcomes of the Ranibizumab for Edema of the mAcula in Diabetes (READ-2) Study. *Ophthalmology.* 2010;117(11):2146-2151.
160. Mrejen S, Spaide RF. Optical coherence tomography: Imaging of the choroid and beyond. *Surv Ophthalmol.* 2013;58(5):387-429.
161. Parver LM, Auken C, Carpenter DO. Choroidal blood flow as a heat dissipating mechanism in the macula. *Am J Ophthalmol.* 1980;89(5):641-646.
162. Alm A, Bill A. Ocular and optic nerve blood flow at normal and increased intraocular pressures in monkeys (*Macaca irus*): a study with radioactively labelled microspheres including flow determinations in brain and some other tissues. *Exp Eye Res.* 1973;15(1):15-29.
163. Hayreh SS. The blood supply of the optic nerve head and the evaluation of it - myth and reality. *Prog Retin Eye Res.* 2001;20(5):563-593.
164. Nickla DL, Wallman J. The multifunctional choroid. *Prog Retin Eye Res.* 2010;29(2):144-168.
165. May CA. Non-vascular smooth muscle cells in the human choroid: distribution, development and further characterization. *J Anat.* 2005;207(4):381-390.
166. Poukens V, Glasgow BJ, Demer JL. Nonvascular contractile cells in sclera and choroid of humans and monkeys. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39(10):1765-1774.

167. Flügel-Koch C, May CA, Lütjen-Drecoll E. Presence of a contractile cell network in the human choroid. *Ophthalmol J Int d'ophtalmologie Int J Ophthalmol Zeitschrift für Augenheilkd.* 1996;210(5):296-302.
168. Del Priore L V, Geng L, Tezel TH, Kaplan HJ. Extracellular matrix ligands promote RPE attachment to inner Bruch's membrane. *Curr Eye Res.* 2002;25(2):79-89.
169. Gong J, Sagiv O, Cai H, Tsang SH, Del Priore L V. Effects of extracellular matrix and neighboring cells on induction of human embryonic stem cells into retinal or retinal pigment epithelial progenitors. *Exp Eye Res.* 2008;86(6):957-965.
170. Bhutto I, Luty G. Understanding age-related macular degeneration (AMD): relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex. *Mol Aspects Med.* 2012;33(4):295-317.
171. Alm A, Bill A. Ocular and optic nerve blood flow at normal and increased intraocular pressures in monkeys (*Macaca irus*): a study with radioactively labelled microspheres including flow determinations in brain and some other tissues. *Exp Eye Res.* 1973;15(1):15-29.
172. Hickam JB, Frayser R, Ross JC. A study of retinal venous blood oxygen saturation in human subjects by photographic means. *Circulation.* 1963;27:375-385.
173. Törnquist P, Alm A. Retinal and choroidal contribution to retinal metabolism in vivo. A study in pigs. *Acta Physiol Scand.* 1979;106(3):351-357.
174. Alm A, Bill A. Blood flow and oxygen extraction in the cat uvea at normal and high intraocular pressures. *Acta Physiol Scand.* 1970;80(1):19-28.
175. Cohan BE, Cohan SB. Flow and oxygen saturation of blood in the anterior ciliary vein of the dog eye. *Am J Physiol.* 1963;205(1):60-66.
176. Foulds WS. The choroidal circulation and retinal metabolism--an overview. *Eye (Lond).* 1990;4 (Pt 2):243-248.
177. Johnson PC. Review of previous studies and current theories of autoregulation. *Circ Res.* 1964;15:SUPPL:2-9.
178. Friedman E. Choroidal blood flow. Pressure-flow relationships. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960).* 1970;83(1):95-99.
179. Lütjen-Drecoll E. Choroidal innervation in primate eyes. *Exp Eye Res.* 2006;82(3):357-361.
180. Polska E, Simader C, Weigert G, et al. Regulation of choroidal blood flow during combined changes in intraocular pressure and arterial blood pressure. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(8):3768-3774..
181. Riva CE, Titze P, Hero M, Movaffaghy A, Petrig BL. Choroidal blood flow during isometric exercises. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997;38(11):2338-2343.

182. Riva CE, Titze P, Hero M, Petrig BL. Effect of acute decreases of perfusion pressure on choroidal blood flow in humans. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997;38(9):1752-1760.
183. Bergmanson JPG. The ophthalmic innervation of the uvea in monkeys. *Exp Eye Res.* 1977;24(3):225-240.
184. Feeney ABL, Hogan MJ. Electron Microscopy of the Human Choroid. *Am J Ophthalmol.* 1961;51(5):1057/185-1072/200.
185. Adhi M, Duker JS. Optical coherence tomography--current and future applications. *Curr Opin Ophthalmol.* 2013;24(3):213-221.
186. Adhi M, Liu JJ, Qavi AH, *et al.* Choroidal analysis in healthy eyes using swept-source optical coherence tomography compared to spectral domain optical coherence tomography. *Am J Ophthalmol.* 2014;157(6).
187. Waldstein SM, Faatz H, Szimacsek M, *et al.* Comparison of penetration depth in choroidal imaging using swept source vs spectral domain optical coherence tomography. *Eye (Lond).* 2015;29(3):409-415.
188. Margolis R, Spaide RF. A Pilot Study of Enhanced Depth Imaging Optical Coherence Tomography of the Choroid in Normal Eyes. *Am J Ophthalmol.* 2009;147(5):811-815.
189. Barteselli G, Chhablani J, El-Emam S, *et al.* Choroidal volume variations with age, axial length, and sex in healthy subjects: a three-dimensional analysis. *Ophthalmology.* 2012;119(12):2572-2578.
190. Sanchez-Cano A, Orduna E, Segura F, *et al.* Choroidal thickness and volume in healthy young white adults and the relationships between them and axial length, ametropia and sex. *Am J Ophthalmol.* 2014;158(3):574-83.e1.
191. Feeney-Burns L, Burns RP, Gao CL. Age-related macular changes in humans over 90 years old. *Am J Ophthalmol.* 1990;109(3):265-278.
192. Ramrattan RS, van der Schaft TL, Mooy CM, de Bruijn WC, Mulder PG, de Jong PT. Morphometric analysis of Bruch's membrane, the choriocapillaris, and the choroid in aging. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994;35(6):2857-2864.
193. Sarks SH. Ageing and degeneration in the macular region: a clinico-pathological study. *Br J Ophthalmol.* 1976;60(5):324-341.
194. Ruiz-Medrano J, Flores-Moreno I, Peña-García P, Montero JA, Duker JS, Ruiz-Moreno JM. Macular choroidal thickness profile in a healthy population measured by swept-source optical coherence tomography. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55(6):3532-3542.
195. Benavente-Pérez A, Hosking SL, Logan NS, Bansal D. Reproducibility-repeatability of choroidal thickness calculation using optical coherence tomography. *Optom Vis Sci.* 2010;87(11):867-872.

196. Esmaeelpour M, Považay B, Hermann B, et al. Mapping choroidal and retinal thickness variation in type 2 diabetes using three-dimensional 1060-nm optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(8):5311-5316.
197. Hirata M, Tsujikawa A, Matsumoto A, et al. Macular choroidal thickness and volume in normal subjects measured by swept-source optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(8):4971-4978.
198. Li XQ, Larsen M, Munch IC. Subfoveal choroidal thickness in relation to sex and axial length in 93 Danish university students. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(11):8438-8441.
199. Fujiwara T, Imamura Y, Margolis R, Slakter JS, Spaide RF. Enhanced depth imaging optical coherence tomography of the choroid in highly myopic eyes. *Am J Ophthalmol.* 2009;148(3):445-450.
200. Ikuno Y, Tano Y. Retinal and choroidal biometry in highly myopic eyes with spectral-domain optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(8):3876-3880.
201. Ikuno Y, Kawaguchi K, Nouchi T, Yasuno Y. Choroidal thickness in healthy Japanese subjects. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(4):2173-2176.
202. Ooto S, Hangai M, Tomidokoro A, et al. Effects of age, sex, and axial length on the three-dimensional profile of normal macular layer structures. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(12):8769-8779.
203. Manjunath V, Taha M, Fujimoto JG, Duker JS. Choroidal thickness in normal eyes measured using Cirrus HD optical coherence tomography. *Am J Ophthalmol.* 2010;150(3):325-329.e1.
204. Manjunath V, Fujimoto JG, Duker JS. Cirrus HD-OCT high definition imaging is another tool available for visualization of the choroid and provides agreement with the finding that the choroidal thickness is increased in central serous chorioretinopathy in comparison to normal eyes. *Retina.* 2010;30(8):1320-1-2.
205. Read SA, Collins MJ, Sander BP. Human optical axial length and defocus. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(12):6262-6269.
206. Esmaeelpour M, Povazay B, Hermann B, et al. Three-dimensional 1060-nm OCT: choroidal thickness maps in normal subjects and improved posterior segment visualization in cataract patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(10):5260-5266.
207. Ho J, Branchini L, Regatieri C, Krishnan C, Fujimoto JG, Duker JS. Analysis of normal peripapillary choroidal thickness via spectral domain optical coherence tomography. *Ophthalmology.* 2011;118(10):2001-2007.

208. Tanabe H, Ito Y, Terasaki H. Choroid is thinner in inferior region of optic disks of normal eyes. *Retina*. 2012;32(1):134-139.
209. Tan CS, Ouyang Y, Ruiz H, Sadda SR. Diurnal variation of choroidal thickness in normal, healthy subjects measured by spectral domain optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(1):261-266.
210. Fryczkowski AW, Hodes BL, Walker J. Diabetic choroidal and iris vasculature scanning electron microscopy findings. *Int Ophthalmol*. 1989;13(4):269-279.
211. Fryczkowski AW, Sato SE, Hodes BL. Changes in the diabetic choroidal vasculature: scanning electron microscopy findings. *Ann Ophthalmol*. 1988;20(8):299-305.
212. Hidayat AA, Fine BS. Diabetic choroidopathy. Light and electron microscopic observations of seven cases. *Ophthalmology*. 1985;92(4):512-522.
213. Nagaoka T, Kitaya N, Sugawara R, et al. Alteration of choroidal circulation in the foveal region in patients with type 2 diabetes. *Br J Ophthalmol*. 2004;88(8):1060-1063.
214. Melancia D, Vicente A, Cunha JP, Pinto LA, Ferreira J. Diabetic choroidopathy: a review of the current literature. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. April 2016 Aug;254(8):1453-61.
215. Ferrara D, Waheed NK, Duker JS. Investigating the choriocapillaris and choroidal vasculature with new optical coherence tomography technologies. *Prog Retin Eye Res*. 2016 May;52:130-55.
216. Jeoung JW, Kim T-W, Weinreb RN, Kim SH, Park KH, Kim DM. Diagnostic ability of spectral-domain versus time-domain optical coherence tomography in preperimetric glaucoma. *J Glaucoma*. 23(5):299-306.
217. Spaide RF, Koizumi H, Pozzoni MC, Pozzoni MC. Enhanced depth imaging spectral-domain optical coherence tomography. *Am J Ophthalmol*. 2008;146(4):496-500.
218. Masland RH. The fundamental plan of the retina. *Nat Neurosci*. 2001;4(9):877-886.
219. Metea MR, Newman EA. Signalling within the neurovascular unit in the mammalian retina. *Exp Physiol*. 2007;92(4):635-640.
220. Muir ER, Rentería RC, Duong TQ. Reduced ocular blood flow as an early indicator of diabetic retinopathy in a mouse model of diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(10):6488-6494.
221. Simó R, Hernández C. Neurodegeneration in the diabetic eye: New insights and therapeutic perspectives. *Trends Endocrinol Metab*. 2014;25(1):23-33.
222. Querques G, Lattanzio R, Querques L, et al. Enhanced Depth Imaging Optical Coherence Tomography in Type 2 Diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(10):6017-6024.
223. Vujosevic S, Martini F, Cavarzeran F, Pilotto E, Midena E. Macular and Peripapillary Choroidal Thickness in Diabetic Patients. *Retina*. 2012;32(October 2012):1.

224. Esmaeelpour M, Brunner S, Shahrezaei S, et al. Choroidal Thinning in Diabetes Type 1 Detected by 3-Dimensional 1060 nm Optical Coherence Tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(11):6803-6809.
225. McCourt EA, Cadena BC, Barnett CJ, Ciardella AP, Mandava N, Kahook MY. Measurement of subfoveal choroidal thickness using spectral domain optical coherence tomography. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*. 41 Suppl:S28-33.
226. Caio V Regatieri, Lauren Branchini, Jill Carmody, James G Fujimoto JSD. Choroidal Thickness in Patients With Diabetic Retinopathy Analyzed By Spectral-Domain Optical. *Retina*. 2012;32(3):563-568.
227. Xu J, Xu L, Du KF, et al. Subfoveal choroidal thickness in diabetes and diabetic retinopathy. *Ophthalmology*. 2013;120(10):2023-2028.
228. Wakatsuki Y, Shinojima A, Kawamura A, Yuzawa M. Correlation of Aging and Segmental Choroidal Thickness Measurement using Swept Source Optical Coherence Tomography in Healthy Eyes. *PLoS One*. 2015;10(12):e0144156.
229. Punjabi OS, Kniestedt C, Stamper RL, Lin SC. Dynamic contour tonometry: Principle and use. *Clin Exp Ophthalmol*. 2006;34(9):837-840.
230. Kaufmann C, Bachmann LM, Robert YC, Thiel MA. Ocular pulse amplitude in healthy subjects as measured by dynamic contour tonometry. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960)*. 2006;124(8):1104-1108.
231. Willekens K, Rocha R, Van Keer K, et al. Review on Dynamic Contour Tonometry and Ocular Pulse Amplitude. *Ophthalmic Res*. 2016;55(2):91-98.
232. Orlov SN, Platonova A a, Hamet P, Grygorczyk R. Cell volume and monovalent ion transporters: their role in cell death machinery triggering and progression. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2013;305(4):C361-72.
233. Yulek F, Ugurlu N, Onal ED, et al. Choroidal changes and duration of diabetes. *Semin Ophthalmol*. 2014;29(2):80-84.
234. Kawagishi T, Nishizawa Y, Emoto M, et al. Impaired retinal artery blood flow in IDDM patients before clinical manifestations of diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 1995;18(12):1544-1549.
235. Kiel JW, Shepherd AP. Autoregulation of choroidal blood flow in the rabbit. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 1992;33(8):2399-2410.
236. Kiel JW, Van Heuven WAJ. Ocular perfusion pressure and choroidal blood flow in the rabbit. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 1995;36(3):579-585.
237. Lütjen-Drecoll E. Choroidal innervation in primate eyes. *Exp Eye Res*. 2006;82(3):357-361.
238. Cioffi GA, Granstam E, Alm A. Ocular circulation. *Kaufman PL, Alm A, eds Adler's Physiol*

- Eye*, 10th ed St Louis Mosby, 2003 747-784. 2003;10(5 Suppl 1):S62-4.
239. Stone RA. Neuropeptide Y and the innervation of the human eye. *Exp Eye Res.* 1986;42(4):349-355.
 240. Ruskell GL. Facial parasympathetic innervation of the choroidal blood-vessels in monkeys. *Exp Eye Res.* 1971;12(2).
 241. Alm A. The effect of sympathetic stimulation on blood flow through the uvea, retina and optic nerve in monkeys (*Macaca irus*). *Exp Eye Res.* 1977;25(1):19-24.
 242. Kawarai M, Koss MC. Sympathetic vasoconstriction in the rat anterior choroid is mediated by alpha1-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol.* 1998;363(1):35-40.
 243. Steinle JJ, Krizsan-Agbas D, Smith PG. Regional regulation of choroidal blood flow by autonomic innervation in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000;279(1):R202-9.
 244. Bill A, Linder J. Sympathetic control of cerebral blood flow in acute arterial hypertension. *Acta Physiol Scand.* 1976;96(1):114-121.
 245. Delaey C, Van De Voorde J. Regulatory mechanisms in the retinal and choroidal circulation. *Ophthalmic Res.* 2000;32(6):249-256.
 246. Unsal E, Eltutar K, Zirtiloğlu S, Dinçer N, Özdoğan Erkul S, Güngel H. Choroidal thickness in patients with diabetic retinopathy. *Clin Ophthalmol.* 2014;8:637-642.
 247. Lee HK, Lim JW, Shin MC. Comparison of choroidal thickness in patients with diabetes by spectral-domain optical coherence tomography. *Korean J Ophthalmol.* 2013;27(6):433-439.
 248. Kim JT, Lee DH, Joe SG, Kim JG, Yoon YH. Changes in choroidal thickness in relation to the severity of retinopathy and macular edema in type 2 diabetic patients. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54(5):3378-3384.
 249. Gerendas BS, Waldstein SM, Simader C, *et al.* Three-dimensional automated choroidal volume assessment on standard spectral-domain optical coherence tomography and correlation with the level of diabetic macular edema. *Am J Ophthalmol.* 2014;158(5):1039-1048.
 250. Zhang Z, Meng X, Wu Z, *et al.* Changes in Choroidal Thickness After Panretinal Photocoagulation for Diabetic Retinopathy: A 12-Week Longitudinal Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015;56(4):2631-2638.
 251. Shao L, Xu L, Chen CX, *et al.* Reproducibility of subfoveal choroidal thickness measurements with enhanced depth imaging by spectral-domain optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54(1):230-233.
 252. Yumusak E, Ornek K, Durmaz SA, Cifci A, Guler HA, Bacanlı Z. Choroidal thickness in obese

- women. *BMC Ophthalmol*. 2016;16(1):48.
253. Dogan B, Kazim Erol M, Dogan U, *et al*. The retinal nerve fiber layer, choroidal thickness, and central macular thickness in morbid obesity: an evaluation using spectral-domain optical coherence tomography. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20(5):886-891.
 254. Ames A, Li YY, Heher EC, Kimble CR. Energy metabolism of rabbit retina as related to function: high cost of Na⁺ transport. *J Neurosci*. 1992;12(3):840-853.
 255. Yang JH, Basinger SF, Gross RL, Wu SM. Blue light-induced generation of reactive oxygen species in photoreceptor ellipsoids requires mitochondrial electron transport. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44(3):1312-1319.
 256. Demontis GC, Longoni B, Marchiafava PL. Molecular steps involved in light-induced oxidative damage to retinal rods. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43(7):2421-2427.
 257. Kumar B, Gupta SK, Srinivasan BP, *et al*. Hesperetin rescues retinal oxidative stress, neuroinflammation and apoptosis in diabetic rats. *Microvasc Res*. 2013;87:65-74.
 258. Enzsoly A, Szabo A, Kantor O, *et al*. Pathologic alterations of the outer retina in streptozotocin-induced diabetes. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55(6):3686-3699.
 259. Holfort SK, Jackson GR, Larsen M. Dark adaptation during transient hyperglycemia in type 2 diabetes. *Exp Eye Res*. 2010;91(5):710-714.
 260. Harrison WW, Bearse MA, Ng JS, *et al*. Multifocal electroretinograms predict onset of diabetic retinopathy in adult patients with diabetes. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(2):772-777.
 261. Muir ER, Renteria RC, Duong TQ. Reduced ocular blood flow as an early indicator of diabetic retinopathy in a mouse model of diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(10):6488-6494.
 262. Cao J, McLeod S, Merges CA, Luttly GA. Choriocapillaris degeneration and related pathologic changes in human diabetic eyes. *Arch Ophthalmol*. 1998;116(5):589-597.
 263. Rajala A, Dighe R, Agbaga M-P, Anderson RE, Rajala RVS. Insulin receptor signaling in cones. *J Biol Chem*. 2013;288(27):19503-19515.
 264. Reiter CEN, Wu X, Sandrasegarane L, *et al*. Diabetes reduces basal retinal insulin receptor signaling reversal with systemic and local insulin. *Diabetes*. 2006;55(4):1148-1156.
 265. Kern TS, Berkowitz BA. Photoreceptors in diabetic retinopathy. *J Diabetes Investig*. 2015;6(4):371-380.
 266. Du Y, Veenstra A, Palczewski K, Kern TS. Photoreceptor cells are major contributors to diabetes-induced oxidative stress and local inflammation in the retina. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(41):16586-16591.
 267. Arden GB. The absence of diabetic retinopathy in patients with retinitis pigmentosa:

- implications for pathophysiology and possible treatment. *Br J Ophthalmol*. 2001;85(3):366-370.
268. De Gooyer TE, Stevenson KA, Humphries P, Simpson DAC, Gardiner TA, Stitt AW. Retinopathy is reduced during experimental diabetes in a mouse model of outer retinal degeneration. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(12):5561-5568.
 269. Arden GB, Arden GB, Sidman RL, *et al*. Spare the rod and spoil the eye. *Br J Ophthalmol*. 2005;89(August):764-769.
 270. Arden GB, Sivaprasad S. The pathogenesis of early retinal changes of diabetic retinopathy. *Doc Ophthalmol*. 2012;124(1):15-26.
 271. Arden GB, Sivaprasad S. Hypoxia and oxidative stress in the causation of diabetic retinopathy. *Curr Diabetes Rev*. 2011;7(5):291-304.
 272. Schmitz Y, Witkovsky P. Dependence of photoreceptor glutamate release on a dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Neuroscience*. 1997;78(4):1209-1216.
 273. Berkowitz BA, Gadianu M, Bissig D, Kern TS, Roberts R. Retinal ion regulation in a mouse model of diabetic retinopathy: Natural history and the effect of Cu/Zn superoxide dismutase overexpression. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50(5):2351-2358.
 274. Berkowitz BA, Roberts R, Stemmler A, Luan H, Gadianu M. Impaired apparent ion demand in experimental diabetic retinopathy: Correction by lipoic acid. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48(10):4753-4758.
 275. Kamp TJ, Hell JW. Regulation of Cardiac L-Type Calcium Channels by Protein Kinase A and Protein Kinase C. *Circ Res*. 2000;87(12):1095-1102.
 276. Pulido JE, Pulido JS, Erie JC, *et al*. A role for excitatory amino acids in diabetic eye disease. *Exp Diabetes Res*. 2007;2007.
 277. Vujosevic S, Midena E. Retinal layers changes in human preclinical and early clinical diabetic retinopathy support early retinal neuronal and müller cells alterations. *J Diabetes Res*. 2013;2013.
 278. Chhablani J, Sharma A, Goud A, *et al*. Neurodegeneration in Type 2 Diabetes: Evidence From Spectral-Domain Optical Coherence Tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56(11):6333-6338.
 279. Carpineto P, Toto L, Aloia R, *et al*. Neuroretinal alterations in the early stages of diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *Eye (Lond)*. 2016;30(5):673-679.
 280. van Dijk HW, Verbraak FD, Kok PHB, *et al*. Early neurodegeneration in the retina of type 2 diabetic patients. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(6):2715-2719.
 281. van Dijk HW, Verbraak FD, Kok PHB, *et al*. Decreased retinal ganglion cell layer thickness in patients with type 1 diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51(7):3660-3665.

282. Sohn EH, van Dijk HW, Jiao C, et al. Retinal neurodegeneration may precede microvascular changes characteristic of diabetic retinopathy in diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;1-10.
283. Demirkaya N, van Dijk HW, van Schuppen SM, et al. Effect of age on individual retinal layer thickness in normal eyes as measured with spectral-domain optical coherence tomography. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(7):4934-4940.
284. Gastinger MJ, Kunselman AR, Conboy EE, Bronson SK, Barber AJ. Dendrite remodeling and other abnormalities in the retinal ganglion cells of Ins2 Akita diabetic mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(6):2635-2642.
285. Antonetti DA, Klein R, Gardner TW. Diabetic Retinopathy. *N Engl J Med*. 2012;366(13):1227-1239.